



Impact de la consommation chronique d'éthanol sur l'ischémie cérébrale : aspect clinique et aspect expérimental chez le rat

Aude Ducroquet

► To cite this version:

Aude Ducroquet. Impact de la consommation chronique d'éthanol sur l'ischémie cérébrale : aspect clinique et aspect expérimental chez le rat. Médecine humaine et pathologie. Université du Droit et de la Santé - Lille II, 2015. Français. NNT : 2015LIL2S069 . tel-01360091

HAL Id: tel-01360091

<https://theses.hal.science/tel-01360091>

Submitted on 5 Sep 2016

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

UNIVERSITE Lille – Nord de France

Faculté de médecine

Année 2015

N° _____

THESE

POUR L'OBTENTION DU GRADE DE

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE LILLE - NORD DE FRANCE

Discipline : Neurosciences

Présentée par

Aude Ducroquet

**Impact de la consommation chronique d'éthanol sur l'ischémie
cérébrale : aspect clinique et aspect expérimental chez le rat**

Directeur de Thèse : Didier Leys

Soutenue le 17 Décembre 2015

JURY

Carine Ali

Yannick Béjot

Sara Morley-Fletcher

Mickael Naassila

Didier Leys

Rapporteur

Rapporteur

Examineur

Examineur

Directeur de thèse

A mon grand-père Jean-Baptiste [†],

A Pierre,

A mes parents,

A ma filleule Amance,

Ce travail de recherche a été réalisé dans le laboratoire de pharmacologie médicale, au sein de l'équipe INSERM U 1171, sous la direction du Professeur Didier Leys.

Je remercie Madame le Professeur Carine Ali d'avoir accepté d'être rapporteur de ce travail. Vous me faites l'honneur d'accepter une ultime fois d'examiner ce travail, auquel vous avez contribué par vos précieux conseils en tant que membre du Comité de Suivi de Thèse.

Je remercie Monsieur le Professeur Yannick Béjot d'avoir accepté de juger ce travail. Soyez assuré de ma reconnaissance.

Je remercie Madame le Docteur Sara Morley-Fletcher d'avoir accepté d'examiner ce travail, auquel vous avez activement contribué par votre participation au Comité de Suivi de Thèse.

Je remercie Monsieur le Professeur Mickael Naassila d'avoir accepté d'être examinateur de ce travail. Soyez assuré de ma gratitude.

Je remercie le Professeur Régis Bordet de m'avoir accueillie dans son laboratoire. Merci de m'avoir accordé votre confiance afin de mener à bien cette étude translationnelle. Vos nombreux conseils m'ont permis de clarifier mes idées dans l'avancement de ce projet. Soyez assuré de ma reconnaissance et de mon plus profond respect.

Je remercie le Professeur Didier Leys d'avoir accepté de me rencontrer il y a près de 4 ans pour ce projet qui se finalise dans la présente thèse. Merci pour votre encadrement, votre disponibilité et votre aide. Je vous suis sincèrement reconnaissante. Ces années m'ont également permis d'enrichir ma connaissance de l'Histoire des Flandres. Comme un clin d'œil, cette thèse se clôture ainsi sur la date anniversaire du couronnement de Léopold II.

J'ajoute un énorme merci au personnel du laboratoire de pharmacologie pour son enthousiasme et sa sympathie. Les pots vont me manquer !

A Maud,

Je tiens à te remercier tout particulièrement. Merci d'avoir partagé avec moi ton savoir-faire. Sans toi, ce projet n'aurait pas eu lieu d'être. Merci pour ton aide précieuse tout au long des années que j'ai passées au laboratoire. Courage car désormais c'est à ton tour de prendre la relève des doctorants...

A tous les accros du mojito, ces personnes se reconnaîtront...

Aux grands fous du bureau, Aurély, Bruce *alias* Bisstooflex, Charlotte et Killy,

Un grand merci pour tous ces moments inoubliables passés à vos côtés, moments bien trop nombreux pour les citer tous... Les *post-it* gorgés d'amitiés, les pauses musicales, les cafés, les vannes « Joe la feinte », les gourmandises, les plantes biscornues mal-aimées, toutes ces petites choses qui font qu'on a formé une sacrée équipe ! Merci à Florette la crête également d'avoir vivement participé à la vie du bureau et (malheureusement pour toi) à l'attribution des surnoms foireux.

A Camille, Claire, Julie, Yao, Florent et Adeline,

C'est un merci plein de rires et de souvenirs conviviaux d'apéritifs/restau que je vous adresse.

A Sandrine,

Pour nos agréables échanges autour de nombreuseeeesss croquettes... A travers vents et marées, nous nous sommes serré les coudes ! Merci.

Merci à toutes ces personnes qui ont contribué à la réflexion, à l'élaboration des protocoles et à l'organisation administrative de ma thèse et dont l'originalité et la bonne humeur ont pigmenté ma vie au laboratoire : Christian, Cédrick, David, Dominique, Jackie, JC, Marion, Michèle, Mr Caron, Nadine, Olivier, Sophie, Thavarak et Vincent. Merci également aux personnes que j'ai eu la chance de croiser dans les couloirs, à la salle café, ou même lorsque j'arrivais ou lorsque je quittais le laboratoire: Amélie, Bérangère, Jérémy, Johanna, Kevin, Laura, Louise, Marine, Nicolas, et Sylvie.

Un grand merci à mes parents de m'avoir permis d'en arriver là et de me donner sans cesse leur amour inconditionnel. Merci à mon frère Florian, mon double avec qui je pourrais conquérir le monde entier. Merci à Charline, ma ch'tite belle-sœur, à Amance, ma filleule chérie, et à Aubin, mon neveu adoré, d'avoir coloré ma vie de votre joie de vivre. Vous savoir à mes côtés me donne la force de me dépasser chaque jour.

Clin d'œil affectueux pour Mamie, Tatie, Tonton Fab, Paul, Anne-Lise, et la famille Ducroquet. Merci à Marraine et Parrain d'avoir toujours été présents pour moi.

J'envoie toute ma tendresse à ma deuxième famille D'haussy-Plet.

A ma meilleure amie, Anne, merci de me soutenir dans toutes les épreuves. Ton amitié m'est essentielle pour avancer. Un grand merci pour les corrections orthographiques de dernière minute !

A mes amis chers à mes yeux, merci d'avoir égayé ma vie de thésarde : Marion avec qui j'ai pu reposer mon esprit lors de nos nombreux déjeuners dans la salle Euréka, Henri, Alisson, Mathieu, Sandra, Steven, Florence et Juliette, pour nos moments de pur bonheur passés ensemble, mais aussi Anne-Laure, Gigi et Julien pour notre amitié distante et indestructible. Je suis fière d'avoir des amitiés comme celles-ci, pleines de sincérité et de rigolades.

Merci à mes amis de la faculté qui se tiennent toujours à mes côtés, Agathe, David et Kelly. Nous avons construit tout au long de nos années universitaires des belles amitiés ! Promis, je quitte le cursus universitaire et vous rejoins dans le monde du travail...

Merci également à toute la *team* Lisou, Baptiste, Cha, Pierre, Capi, Soso, Quentin, Anne-Pri, Charly, Margaux et Choinou pour les soirées festives et dansantes ! Grâce à Pierre, j'ai eu la chance de vous rencontrer. Des années de chorés et de délires nous attendent !

Pierre, merci de m'avoir accompagnée durant cette aventure et d'avoir rempli notre quotidien de rires et surtout d'amour. Notre périple ne fait que commencer. Quitte à être *kitch*, merci à ma chatte Pouillepouille qui a rendu mes journées (surtout de rédaction) plus sereines.

Sommaire

SOMMAIRE.....	6
INTRODUCTION	16
I. Mécanismes de l'immunité innée dans l'ischémie cérébrale : rôle de la microglie et des polynucléaires neutrophiles	23
1. Agents inducteurs de l'immunité innée.....	23
2. Rôle et recrutement de la microglie et des polynucléaires neutrophiles durant l'ischémie cérébrale	24
A. Microglie.....	24
i. Origine et rôle de la microglie	24
ii. Activation et prolifération temporelles des cellules microgliales	24
B. Polynucléaires neutrophiles.....	26
i. Origine et rôle des polynucléaires neutrophiles.....	26
ii. Recrutement et infiltration temporels des polynucléaires neutrophiles	27
3. Choix du modèle pré-clinique d'ischémie cérébrale pour l'étude des cellules inflammatoires périphériques	29
4. Impact de la microglie et des polynucléaires neutrophiles sur la sévérité de l'ischémie cérébrale	30
A. Impact de la microglie sur la sévérité de l'ischémie cérébrale	30
i. Rôle de la microglie dans la sévérité de l'ischémie cérébrale	30
ii. Modulation de l'activation microgliale.....	31
B. Impact des polynucléaires neutrophiles sur la sévérité de l'ischémie cérébrale.....	32
i. Rôle des polynucléaires neutrophiles dans la sévérité de l'ischémie cérébrale.....	32
ii. Modulation des facteurs associés à l'activation et au recrutement des polynucléaires neutrophiles	33
iii. Modulation des facteurs associés à l'adhésion des polynucléaires neutrophiles sur les cellules endothéliales	34
iv. Modulation des facteurs associés à la rupture de la BHE	35
v. Modulation des acteurs liés au phénotype N2 des polynucléaires neutrophiles	36
5. Impact des comorbidités sur l'ischémie cérébrale: rôle de la microglie et des polynucléaires neutrophiles.....	37
A. Impact des comorbidités sur la sévérité de l'ischémie cérébrale	38

B. Rôle de la microglie dans un contexte inflammatoire systémique et ischémie cérébrale	38
C. Rôle des polynucléaires neutrophiles dans un contexte inflammatoire systémique et l'ischémie cérébrale	39
II. Impact de la consommation chronique d'éthanol sur l'immunité innée du cerveau et du foie : rôle des polynucléaires neutrophiles et des macrophages résidents	40
1. Pharmacocinétique de l'éthanol	40
2. Physiopathologie et progression des lésions hépatiques vers un terrain inflammatoire lors d'une consommation chronique d'éthanol	41
A. Métabolisme de l'éthanol dans le foie	41
B. Conséquences physiopathologiques de l'oxydation de l'éthanol au sein du foie suite à une consommation chronique d'éthanol	41
C. Biomarqueurs sanguins d'une atteinte hépatique due à la consommation chronique d'éthanol	43
D. Facteurs modulateurs des lésions liées à la consommation chronique d'éthanol.	44
E. Effets directs et indirects de la consommation chronique d'éthanol sur l'inflammation cérébrale et hépatique	45
i. Induction de l'état inflammatoire dans le foie suite à une consommation chronique d'éthanol	45
ii. Impact de la consommation chronique d'éthanol sur l'immunité innée dans le foie: rôle des polynucléaires neutrophiles	46
3. Conséquences de la consommation chronique d'éthanol sur le cerveau	47
A. Dommages cérébraux dus à la consommation chronique d'éthanol	47
B. Implication de la neuroimmunité dans l'effet neurotoxique de l'éthanol : rôle de la microglie	48
i. Rôle de la microglie dans la neuro-inflammation et la neurodégénérescence suite à une consommation chronique d'éthanol	48
ii. Traitement ciblant la microglie et les facteurs associés dans un contexte d'alcoolisation	49
iii. Association entre l'activation microgliale et les perturbations de la neurotransmission	49
4. Axe foie-cerveau	50
III. Impact de la consommation chronique d'éthanol sur l'ischémie cérébrale	52

1.	Consommation chronique d'éthanol : facteur de risque d'ischémie cérébrale	52
A.	Facteur de survenue d'une ischémie cérébrale	52
B.	Facteur de mortalité suite à une ischémie cérébrale.....	53
2.	Facteur modulateur des déficits fonctionnels suite à l'ischémie cérébrale.....	54
3.	Facteur de sévérité de l'ischémie cérébrale	56
A.	Impact de la consommation chronique d'éthanol sur la sévérité de l'ischémie cérébrale	56
B.	Mécanismes sous-jacents liés à l'impact de la consommation chronique d'éthanol sur l'ischémie cérébrale	57
i.	Excitotoxicité glutamatergique	57
ii.	Stress oxydant et nitrant	58
PRESENTATION DU TRAVAIL		59
METHODES		61
I.	Etude expérimentale animale : matériel et méthodes.....	62
1.	Animaux	62
2.	Modèle d'alcoolisation chronique	62
3.	Modèle d'occlusion intraluminale de l'artère cérébrale moyenne	63
4.	Tests comportementaux	64
A.	Neuroscore de Bederson	65
B.	Test de l'actimétrie	66
C.	Test de retrait du ruban adhésif.....	66
D.	Test de préhension	67
E.	Test du rotarod.....	68
5.	Mise à mort et préparation des tissus	69
A.	Etude histomorphométrique	70
B.	Etudes sanguines et biomoléculaires	71
C.	Etude histologique.....	72
6.	Analyse histomorphométrique.....	72
A.	Coloration au crésyl violet	72
B.	Quantification du volume de l'infarctus cérébral	72
7.	Analyses sanguines et biomoléculaires	73
A.	Collection des échantillons plasmatiques	73
B.	Extraction de l'ARN	73
C.	Synthèse des ADN complémentaires (ADNc)	74

D. PCR quantitative en temps réel.....	74
8. Analyse biochimique.....	75
A. Analyse histologique des lipides hépatiques	75
B. Analyse immunohistochimique.....	76
9. Statistiques.....	76
II. Etude clinique de cohorte : patients et méthode	76
1. Critères d'inclusion et d'exclusion.....	77
2. Imagerie	77
3. Evaluation clinique.....	77
4. Evaluation de la consommation excessive d'éthanol	77
5. Dosages plasmatiques des marqueurs inflammatoires	78
6. Statistiques.....	78
7. Ethique	79
RESULTATS.....	80
I. Suivi des animaux.....	81
1. Suivi de la masse corporelle durant l'alcoolisation	81
2. Mortalité induite par le modèle d'alcoolisation et d'ischémie cérébrale.....	81
II. Caractérisation du modèle d'alcoolisation.....	81
1. Alcoolémie.....	81
2. Dosages plasmatiques des transaminases.....	82
3. Poids du foie rapporté au poids du corps.....	84
4. Stéatose hépatique.....	85
III. Sévérité de l'ischémie cérébrale : volume de l'infarctus et déficits	
neurologiques et fonctionnels	86
1. Analyse histomorphométrique.....	86
2. Déficits neurologiques	88
3. Déficits fonctionnels.....	88
A. Test de l'actimètre.....	88
B. Test de préhension	89
C. Test de retrait du ruban adhésif.....	90
D. Test de l'accélération de vitesse	91

IV. Impact de la sévérité de l'ischémie cérébrale sur l'immunité innée : rôle de l'activation microgliale et des polynucléaires neutrophiles	92
1. Activation microgliale	92
2. Infiltration des polynucléaires neutrophiles dans le cerveau	93
A. Analyse du nombre de polynucléaires neutrophiles infiltrés dans le parenchyme cérébral infarci	93
B. Analyse de l'expression génique des protéines d'adhésion leucocytaire dans l'hémisphère droit : ICAM-1 et VCAM-1	94
i. Analyse de l'expression génique de ICAM-1 et de VCAM-1 dans le cortex de l'hémisphère ipsilatéral	95
ii. Analyse de l'expression génique de ICAM-1 et de VCAM-1 dans le striatum de l'hémisphère ipsilatéral	97
iii. Analyse de l'expression génique de ICAM-1 et de VCAM-1 dans l'hippocampe de l'hémisphère ipsilatéral	98
3. Infiltration des polynucléaires neutrophiles dans le foie	100
A. Analyse du nombre de polynucléaires neutrophiles infiltrés	100
B. Analyse de l'expression génique des protéines d'adhésion leucocytaire dans le foie : ICAM-1 et VCAM-1	101
V. Etude clinique	103
1. Comparaison des dosages des CDT entre les consommateurs excessifs et les non-consommateurs excessifs	103
2. Comparaison des caractéristiques de base entre les consommateurs excessifs et les non-consommateurs excessifs	103
3. Influence de la consommation excessive et chronique d'éthanol sur la sévérité initiale de l'ischémie cérébrale dans <i>Biostroke</i>	104
4. Implication des polynucléaires neutrophiles, et des protéines d'adhésion leucocytaires, dans l'influence de consommation excessive et chronique d'éthanol sur la sévérité de l'ischémie cérébrale	104
5. Implication de la cytolysé hépatique dans l'influence de la consommation excessive et chronique d'éthanol sur la sévérité de l'ischémie cérébrale	105
DISCUSSION	118
I. Résumé des résultats	119
II. Impact de la consommation excessive et chronique sur la sévérité de l'ischémie cérébrale	120

III. Impact de la consommation chronique d'éthanol sur l'immunité innée du cerveau: rôle des polynucléaires neutrophiles et de la microglie	123
IV. Axe cerveau-foie dans un contexte de consommation chronique d'éthanol et/ou d'ischémie cérébrale.....	125
V. Avantages et limites.....	127
VI. Conclusion et perspectives	130
ANNEXE	133
REFERENCES	138

Liste des abréviations

A10	<i>gavage à l'éthanol 10% v/v</i>
A35	<i>gavage à l'éthanol 35% v/v</i>
ACM	<i>artère cérébrale moyenne</i>
ADH	<i>alcool déshydrogénase</i>
AIT	<i>accident ischémique transitoire</i>
ALDH	<i>aldéhyde déshydrogénase</i>
ANOVA	<i>analyse de variance</i>
AVC	<i>accident vasculaire cérébral</i>
BDNF	<i>brain derived neurotrophic factor</i>
BHE	<i>barrière hémato-encéphalique</i>
CCR	<i>CC-chemokine receptor</i>
CDT	<i>Carbohydrate-deficient transferrin</i>
CRP	<i>protéine réactive C</i>
CXCL	<i>CXC-chemokine ligand</i>
CXCR	<i>CXC chemokine receptor</i>
DAMP	<i>damage-associated molecular pattern</i>
EAAT	<i>acide aminé exciteur</i>
FPR	<i>formyl peptide receptor</i>
DSC	<i>débit sanguin cérébral</i>
γGT	<i>gamma glutamyl transférase</i>
G	<i>jour de gavage</i>
GABA-A	<i>acide γ-aminobutyrique A</i>
GRO	<i>growth regulated oncogene</i>
HDL	<i>lipopolysaccharide à haute densité</i>
HMGB-1	<i>high mobility group box 1</i>
HSP72	<i>heat-shock protein 72</i>
Iba-1	<i>molécule adaptatrice liant le calcium ionisants 1</i>
IC	<i>intervalles de confiance</i>
ICAM	<i>intercellular cell adhesion molecule</i>
IFN	<i>interferon</i>
i.g.	<i>intra-gastrique</i>
IL	<i>interleukine</i>
ILR	<i>interleukin receptor</i>
iNOS	<i>oxyde nitrique synthase inductible</i>

i.p.	<i>intra-péritonéal</i>
IP	<i>IFN gamma-induced protein</i>
IQCODE	<i>informant questionnaire on cognitive in the elderly</i>
IQR	<i>étendues interquartiles</i>
IRM	<i>imagerie par résonance magnétique</i>
i.v.	<i>intra-veineuse</i>
IR	<i>ischémie cérébrale et reperfusion</i>
J	<i>jour de reperfusion</i>
LDL	<i>lipoprotéines de basse densité</i>
LPS	<i>lipopolysaccharides</i>
MAC-1	<i>macrophage 1 antigen</i>
OACM	<i>occlusion de l'artère cérébrale moyenne</i>
MCP	<i>monocyte chemoattractant protein</i>
MIP	<i>macrophage inflammatory protein</i>
MMP	<i>matrix metalloproteinase</i>
MPO	<i>myeloperoxidase</i>
NDR	<i>NOD-like</i>
NGF	<i>nerve growth factor</i>
NI	<i>non ischémié/sham</i>
NIHSS	<i>national institutes of health stroke scale</i>
NMDA-R	<i>récepteurs de l'acide N-méthyl-D-aspartique</i>
NO	<i>non-opéré</i>
NOX-2	<i>nicotinamide adenine dinucleotide phosphate oxydase</i>
PFA	<i>paraformaldéhyde</i>
PAMP	<i>pathogen-associated molecular pattern</i>
PNN	<i>polynucléaires neutrophiles</i>
PPAR-γ	<i>peroxisome proliferator-activated receptors-γ</i>
PPR	<i>pattern-recognition receptor</i>
PSGL-1	<i>P-selectin glycoprotein ligand-1</i>
RANTES	<i>regulated on activation normal T cell expressed and secreted</i>
SNCAM	<i>soluble neural cell adhesion molecule</i>
SRAGE	<i>soluble receptor for advanced glycation end products</i>
ROS	<i>radicaux libres oxygénés</i>
RR	<i>risque relatif</i>
rt-PA	<i>recombinant-tissue plasminogen activator</i>
SHR	<i>rat spontanément hypertendu</i>

TBP	<i>TATA Binding Protein</i>
TEP	<i>tomographie d'émission de protons</i>
TGF	<i>transforming growth factor</i>
TGO	<i>glutamoxaloacétate transférase</i>
TGP	<i>glutamopyruvate transférase</i>
TLR	<i>toll-like receptor</i>
TNF	<i>tumor necrosis factor</i>
TOAST	<i>Trial of Org 10172 in Acute Stroke Treatment</i>
VCAM	<i>vascular cell adhesion molecule</i>
VEH	<i>véhicule</i>
VIC	<i>volume d'infarctus cortical</i>
VIS	<i>volume d'infarctus sous-cortical (striatal)</i>
VIT	<i>volume d'infarctus total</i>
VO	<i>volume approché de l'oedème cérébral</i>

Introduction

Le 13 Avril 1737, le Docteur Jenkins étudia un nouveau patient, soudainement figé au sol, paralysé d'un côté du corps, victime d'une « attaque ». Ce malade n'était autre que le célèbre compositeur allemand Georg Friedrich Haendel, victime de ce que l'on appelle aujourd'hui un accident vasculaire cérébral (AVC) défini comme un déficit neurologique focal soudain d'origine vasculaire. Deux cent soixante-dix-sept ans après cet accident, les mécanismes physiopathologiques de l'AVC en phase aiguë sont désormais bien connus, et permettent de distinguer deux sous-types : l'ischémie cérébrale (80% des cas), objet de cette thèse, et l'hémorragie cérébrale (20%), définie comme un saignement dans le cerveau et une compression des aires cérébrales environnantes. Les critères internationaux *Trial of Org 10172 in Acute Stroke Treatment* (TOAST) permettent de classer les différentes étiologies des AVC : athérosclérose, cardioembolie, occlusion de vaisseaux de petit calibre, causes rares, causes inconnues.¹ Bien que les progrès de la recherche soient manifestes dans ce domaine, les AVC restent un problème de santé publique majeur par sa grande fréquence, ses risques de récives, ses séquelles handicapantes, le taux de mortalité associé, et son coût. La prévention des AVC et la recherche de nouveaux traitements sont de réels challenges de santé publique puisque 6,7 millions de personnes en sont décédées en 2012, ce qui place ce type de pathologies vasculaires au deuxième rang des causes de mortalité dans le monde.² C'est pourquoi des recherches en neuroprotection préventive et identification de comorbidités se développent depuis cette dernière décennie dans le domaine des maladies neurovasculaires, notamment des ischémies cérébrales.

L'ischémie cérébrale est caractérisée par une réduction ou une interruption de l'apport sanguin dans une partie du cerveau, due à la formation d'un thrombus athéromateux ou cardio-embolique dans un vaisseau sanguin. Cela engendre la diminution du débit sanguin cérébral (DSC). L'ischémie cérébrale peut être transitoire grâce à une reprise du flux sanguin normal (accident ischémique transitoire, AIT) et ne laisse alors aucune séquelle fonctionnelle. Quand les capacités de suppléance et l'autorégulation du DSC sont dépassées, l'interruption du flux entraîne, au bout de quelques minutes, une zone de destruction tissulaire dans la région cérébrale concernée, appelée cœur nécrotique (figure 1). Ce territoire est irréversiblement endommagé par une déplétion en ATP et une défaillance de la glycolyse aérobie. Sur son pourtour, se forme une zone de pénombre dans laquelle siègent des neurones, des astrocytes, des microglies et d'autres structures parenchymateuses, hypo-perfusés et non-fonctionnels. Cette zone est, cependant, en survie grâce à des systèmes de protection temporaires, vasculaires et métaboliques (figure 1). Ce dysfonctionnement cérébral au sein de la pénombre est donc réversible si le flux sanguin est rapidement rétabli de manière spontanée ou par l'injection intraveineuse (i.v.) du traitement thrombolytique, le *recombinant-tissue plasminogen activator* (rt-PA).³ La thrombolyse

médicamenteuse représente l'unique thérapie efficace pour contrer l'évolution de la pénombre vers un état lésionnel dans l'entière de la zone cérébrale touchée. Cependant, en plus d'être efficace dans une fenêtre thérapeutique restreinte (délai maximal de 4,5 heures), le rt-PA peut provoquer des complications hémorragiques. Au cours des 18 derniers mois, cinq études ont montré un bénéfice de la thrombectomie mécanique ajoutée à la thrombolyse i.v. (ou dans quelques cas à la place de la thrombolyse i.v. chez des patients ayant une contre-indication).⁴⁻⁸ La méta-analyse de ces cinq études récentes ainsi que de trois études plus anciennes qui n'avaient pas montré de bénéfice clair, démontre le rôle majeur du facteur temps.⁹⁻¹²

Le volume de la pénombre ischémique peut être approché cliniquement à l'aide du «*mismatch*» entre l'anomalie de diffusion en imagerie par résonance magnétique (IRM), correspondant en grande partie à l'infarctus, et l'anomalie de perfusion ou l'évaluation clinique des déficits neurologiques par le *National Institutes of Health Stroke Scale* (NIHSS), représentant l'ensemble de l'ischémie cérébrale. Le score NIHSS est établi à l'aide d'une série de 15 tests cliniques réalisés chez le patient (tableau 1), lequel sera noté de 0 (aucun déficit) à 42 points (décédé).¹³

L'attention portée sur l'identification des facteurs de risque vasculaire est primordiale pour prévenir l'apparition d'un infarctus cérébral. Des facteurs non-modulables comme l'âge, l'ethnie et le sexe influencent le risque de survenue d'AVC.¹⁴⁻¹⁶ Des comorbidités comme l'athérosclérose, le diabète, le surpoids, l'hypertension et la consommation excessive et chronique d'alcool, augmentent également le risque d'apparition d'ischémie cérébrale. Cependant une prévention primaire est possible par l'atténuation de ces facteurs. Ceux-ci sont, pour la plupart, également décrits comme des facteurs de sévérité dans les infarctus cérébraux.^{14,17} C'est pourquoi leur identification est essentielle pour, dans un second temps, diminuer leur impact sur les cellules de la pénombre en phase aigüe de l'ischémie cérébrale et atténuer les dommages secondaires plus tardifs.

Une cascade complexe d'événements cellulaires et moléculaires se déroule suite à l'événement ischémique et module le volume lésionnel de l'infarctus (figure 2).¹⁸ Ces mécanismes complexes comprennent la défaillance énergétique, l'excitotoxicité, le stress oxydant, l'inflammation et l'apoptose.^{4,9} La carence en apports nutritifs et d'oxygène conduit à une chute du substrat énergétique, l'ATP, et à la perte des gradients ioniques. La recapture du glutamate étant défaillante, le glutamate libéré se lie aux récepteurs post-synaptiques, entraînant une entrée et une libération de calcium intracellulaire. La fonction de la chaîne respiratoire mitochondriale est également perturbée, conduisant à la production de radicaux libres oxygénés (ROS), délétères pour le bon fonctionnement cellulaire. La mort

apoptotique programmée des cellules est alors activée.⁹ L'inflammation, plus tardive, contribue également à l'aggravation du profil lésionnel.⁴ Des processus de neuroréparation sont déclenchés quelques jours après l'ischémie cérébrale, ce qui permet de pallier partiellement ou intégralement les dégâts causés.¹⁹

L'inflammation joue un rôle important dans le pathophysiologie de l'ischémie cérébrale. Quel que soit le type de lésion ischémique, le cerveau se défend en activant les systèmes de l'immunité innée et de l'immunité adaptative. Ces systèmes complexes consistent en la mise en place d'un processus inflammatoire aigu et prolongé, définie par une activation rapide des cellules résidentes (essentiellement la microglie), une infiltration de cellules périphériques inflammatoires, et une production de médiateurs inflammatoires. L'évolution dans le temps du recrutement des cellules immunitaires telles que les microglies, les polynucléaires neutrophiles (PNN), les monocytes, et les lymphocytes T, dans le cerveau, ainsi que le rôle de ces dernières dans les lésions ischémiques, font l'objet de nombreuses études.^{20,21}

Les tentatives thérapeutiques ciblant la modulation des réponses inflammatoires ont fait leurs preuves dans les modèles expérimentaux. Cependant, elles ont abouti systématiquement à un échec dans les applications cliniques²². Dans ce contexte, l'amélioration de notre compréhension des mécanismes sous-jacents est cruciale. Il est important de reconsidérer le lien que fait la recherche entre les modèles précliniques et l'application clinique. Si les modèles précliniques permettent de s'affranchir des facteurs qui contribuent potentiellement à l'aggravation ou à la neuroprotection des infarctus cérébraux, ils ne représentent pas la réalité du milieu clinique. Afin de limiter le fossé dans la recherche translationnelle, il est de plus en plus reconnu d'élaborer des modèles plus complexes avec l'intégration de nouveaux paramètres, en particulier des phénomènes inflammatoires systémiques induits par des comorbidités. Les comorbidités ont un impact notable sur le risque de survenue et sur la sévérité de l'ischémie cérébrale. Quelques études ont intégré un facteur source d'une charge inflammatoire systémique, comme l'hypertension, le syndrome métabolique ou l'hyperglycémie dans des modèles expérimentaux d'ischémie cérébrale. Elles ont révélé une dérégulation de la réponse immunitaire innée post-ischémique, notamment au niveau de l'activation et du recrutement des microglies et des PNN. A ce jour, le facteur « consommation chronique d'éthanol » n'a pas encore été reporté dans la littérature concernant son impact sur la sévérité de l'ischémie cérébrale et sur l'activation ou l'infiltration des cellules périphériques ou résidentes de l'immunité innée dans un contexte d'ischémie cérébrale.

Pour l'étude de l'impact de la consommation excessive et chronique d'éthanol sur l'infarctus cérébral et de son impact sur les PNN et la microglie, nous développerons, dans

une première partie, leurs caractéristiques suite à une ischémie cérébrale transitoire, leurs implications dans la sévérité de l'ischémie cérébrale ainsi que l'impact des comorbidités sur la sévérité de l'ischémie cérébrale via ces deux types cellulaires. La deuxième partie sera consacrée à l'étude de l'impact de la consommation chronique d'éthanol sur l'immunité innée, et notamment sur l'activation microgliale et les PNN, dans le cerveau et le foie. La troisième partie permettra de faire état des apports de la littérature actuelle concernant l'impact de la consommation chronique d'éthanol sur l'ischémie cérébrale et sur les mécanismes sous-jacents associés.

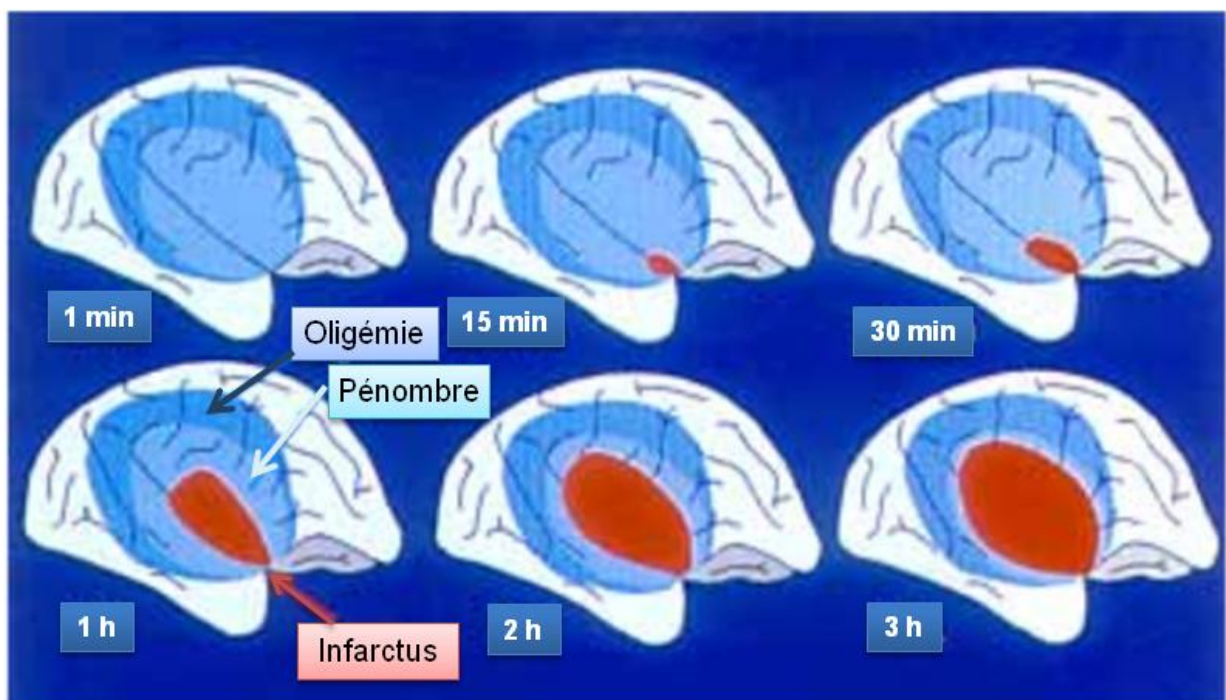


Figure 1 : Diagramme idéalisé du cerveau de babouin montrant l'évolution dans le temps de l'extension de l'infarctus ou noyau ischémique (en rouge), de la pénombre (bleu clair) et de l'oligémie (bleu foncé) immédiatement après d'occlusion de l'artère cérébrale moyenne jusqu'à 3 heures plus tard (d'après²³).

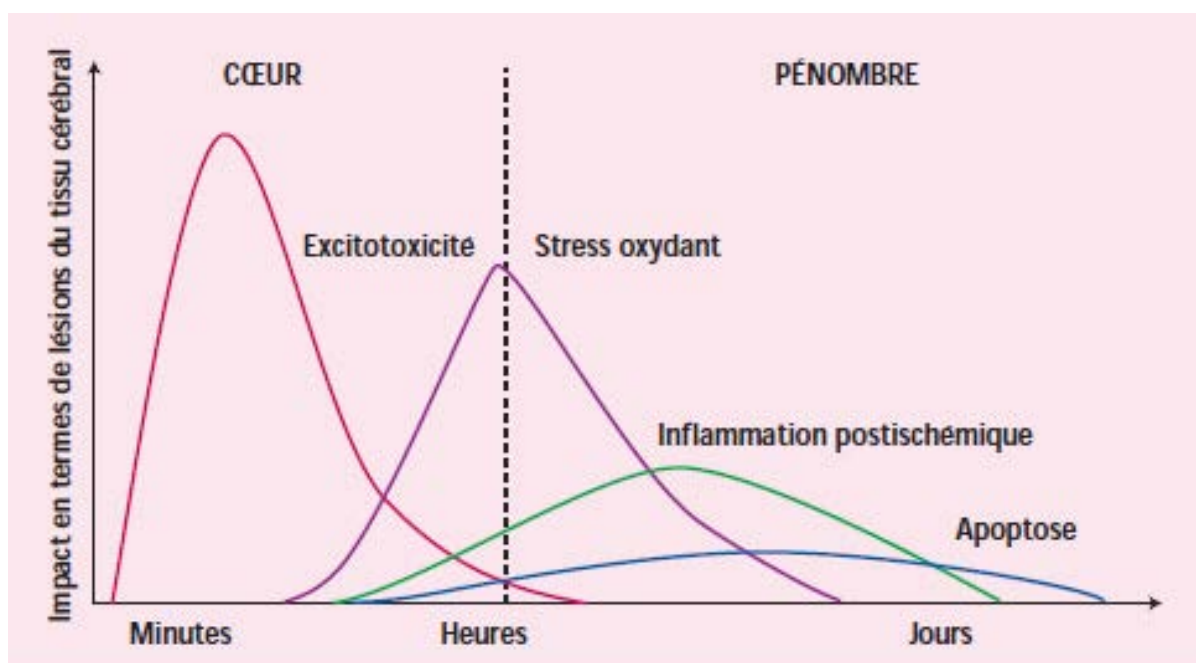


Figure 2 : Evolution temporelle et impact des principaux mécanismes impliqués dans les dommages cellulaires lors d'une ischémie cérébrale (d'après¹⁸).

<p>1a Niveau de conscience</p> <p>0 : vigilance normale, réponses aisées</p> <p>1 : non vigilant, éveillable par des stimulations mineures pour répondre ou exécuter les consignes</p> <p>2 : non vigilant, requiert des stimulations répétées pour maintenir son attention ; ou bien est obnubilé et requiert des stimulations intenses ou douloureuses pour effectuer des mouvements non automatiques</p> <p>3 : répond seulement de façon réflexe ou totalement aréactif</p>
<p>1b Questions : le patient est questionné sur le mois et son âge</p> <p>0 : réponses correctes aux deux questions</p> <p>1 : réponse correcte à une question</p> <p>2 : aucune réponse correcte</p>
<p>1c Commandes : Ouvrir et fermer les yeux, serrer et relâcher la main non parétique</p> <p>0 : exécute les deux tâches correctement</p> <p>1 : exécute une tâche correctement</p> <p>2 : n'exécute aucune tâche</p>
<p>2 Oculomotricité : seuls les mouvements horizontaux sont évalués</p> <p>0 : normal</p> <p>1 : paralysie partielle ; le regard est anormal sur un œil ou les deux, sans déviation forcée du regard ni paralysie complète</p> <p>2 : déviation forcée du regard ou paralysie complète non surmontée par les réflexes oculo-céphaliques</p>
<p>3 Vision</p>

0 : aucun trouble du champ visuel 1 : hémianopsie partielle 2 : hémianopsie totale 3 : double hémianopsie, incluant cécité corticale
4 Paralyse faciale 0 : mouvement normal et symétrique 1 : paralysie mineure (affaissement du sillon nasogénien ; sourire asymétrique) 2 : paralysie partielle : paralysie totale ou presque de l'hémiface inférieure 3 : paralysie complète d'un ou des deux côtés
5 Motricité Membres Supérieurs : bras tendu à 90° en position assise, à 45° en décubitus durant 10 secondes 0 : pas de chute 1 : chute vers le bas avant 10 secondes sans heurter le lit 2 : effort contre pesanteur possible mais le bras ne peut atteindre ou maintenir la position et tombe sur le lit 3 : aucun effort contre pesanteur, le bras tombe 4 : aucun mouvement
6 Motricité Membres Inférieurs : jambes tendues à 30° pendant 5 secondes 0 : pas de chute 1 : chute avant 5 secondes, les jambes ne heurtant pas le lit 2 : effort contre pesanteur mais la jambe chute sur le lit 3 : pas d'effort contre pesanteur 4 : aucun mouvement
7 Ataxie 0 : absente 1 : présente sur un membre 2 : présente sur deux membres
8 Sensibilité : sensibilité à la piqûre ou réaction de retrait après stimulation nociceptive 0 : normale, pas de déficit sensitif 1 : hypoesthésie modérée: le patient sent que la piqûre est atténuée ou abolie mais a conscience d'être touché 2 : anesthésie: le patient n'a pas conscience d'être touché
9 Langage 0 : normal 1 : aphasie modérée: perte de fluence verbale, difficulté de compréhension sans limitation des idées exprimées ou de la forme de l'expression 2 : aphasie sévère: expression fragmentaire, dénomination des objets impossibles; les échanges sont limités, l'examineur supporte le poids de la conversation 3 : aphasie globale: mutisme; pas de langage utile ou de compréhension du langage oral
10 Dysarthrie 0 : normal

1 : modérée: le patient bute sur certains mots, au pire il est compris avec difficultés 2 : sévère : le discours est incompréhensible, sans proportion avec une éventuelle aphasie ; ou bien le patient est mutique ou anarthrique
11 Extinction et négligence 0 : pas d'anomalie 1 : négligence ou extinction visuelle, tactile, auditive ou personnelle aux stimulations bilatérales simultanées 2 : hémignégligence sévère ou extinction dans plusieurs modalités sensorielles ; ne reconnaît pas sa main ou s'oriente vers un seul hém-espace

Tableau 1 : Echelle du NIHSS chez le patient ayant eu un AVC.

I. Mécanismes de l'immunité innée dans l'ischémie cérébrale : rôle de la microglie et des polynucléaires neutrophiles

La réaction inflammatoire est un moyen de défense déployé par l'organisme afin de contrer une invasion par un agent pathogène étranger, une blessure ou un traumatisme tel que l'ischémie cérébrale. L'immunité et l'inflammation représentent deux mécanismes fortement engagés dans la physiopathologie de l'ischémie cérébrale, de l'interruption du DSC passant par le développement des lésions au sein du parenchyme cérébral, à la neuroréparation tissulaire. La barrière inflammatoire est caractérisée par l'intervention rapide du système de l'immunité innée activée par des agents inducteurs issus de la zone infarctée, et, suivie du système de l'immunité adaptative. Les cellules de l'immunité innée sont composées des cellules résidentes (principalement les microglies) et des cellules périphériques infiltrées dans la région touchée par l'ischémie (PNN, monocytes).²⁴ La microglie et le PNN ont été beaucoup étudiés dans le développement des lésions cérébrales dû à l'ischémie cérébrale.²⁵ Leur rôle est encore controversé et évasif puisque les fonctions de ces deux types cellulaires sont imputées aux dommages cérébraux et, paradoxalement, à la régénération des cellules. De plus, les traitements thérapeutiques visant à les réguler sont équivoques. De nouvelles stratégies thérapeutiques, ciblant l'activation ou la fonctionnalité de ces cellules dans des modèles expérimentaux plus complexes et plus proches des cas cliniques, sont développées.

1. Agents inducteurs de l'immunité innée

Lors d'une réaction inflammatoire, deux types d'inducteurs activent la barrière inflammatoire : microbiens/exogènes (*Pathogen-associated molecular patterns*, PAMPs) et non microbiens/endogènes (*Damage-associated molecular patterns*, DAMPs). Ces agents inducteurs sont reconnus par les récepteurs *Pattern-recognition receptors* (PPR) exprimés à

la surface des cellules de l'immunité. Dans le cas d'une ischémie cérébrale, les cellules cérébrales lésées libèrent des DAMPs dans l'environnement extracellulaire, ce qui active le système immunitaire inné.²⁶ Cela est mené par un phénomène inhabituel de déséquestration de cellules ou de molécules (comme le transfert de l'ATP dans le milieu extracellulaire), qui se produit lors de la nécrose cellulaire du cœur de l'infarctus, et qui active les macrophages résidents environnants.²⁶ La reconnaissance de ces motifs est primordiale pour activer la défense immunitaire de l'organisme, cependant cela peut engendrer des conséquences délétères quand cette dernière est excessive.

2. Rôle et recrutement de la microglie et des polynucléaires neutrophiles durant l'ischémie cérébrale

A. Microglie

i. Origine et rôle de la microglie

La microglie est la cellule immunitaire résidente du système nerveux central et représente environ 5 à 10% des cellules du cerveau. Des théories se sont développées et privilégient l'origine mésodermale de la microglie, d'autres suggèrent une origine neuroectodermale ou monocyttaire.²⁷ La cellule microgliale joue un rôle crucial dans l'homéostasie et dans la défense immunitaire du système central nerveux adulte. Elle est capable de phagocyter et de sécréter des cytokines, des protéases, des facteurs de croissance et des ROS. La microglie peut se transformer en phénotype activé, de type M1 (classique) ou de type M2 (dérivé). La figure 3 illustre la différenciation phénotypique de la microglie et les sécrétions associées au phénotype.

ii. Activation et prolifération temporelles des cellules microgliales

La microglie en condition physiologique, dite quiescente, a une morphologie ramifiée. Ces ramifications sont mobiles et en continuelle recherche d'agents inducteurs exogènes ou endogènes. Le terme de quiescence ne représente donc guère le réel état de vigilance dynamique de la microglie. Les fines extensions subissent une reconstruction continuelle afin de permettre une numérisation efficace de leur territoire cérébral.²⁸ Equipées de récepteurs pour la reconnaissance d'une multitude de molécules, comme les récepteurs Toll-like (TLR) ou NOD-like (NDR), elles peuvent immédiatement détecter l'entrée de pathogènes étrangers ou des signes de perturbations d'intégrité structurale et fonctionnelle, ce qui conduit à la transcription de cytokines inflammatoires. La figure 4 décrit les stades de l'activation de la microglie.

Quand des dommages ischémiques s'installent, la microglie capte les DAMPs provenant des cellules lésées, par ses récepteurs TLR dont TLR-2 et TLR-4, et s'active très rapidement (de l'ordre de quelques minutes). Une fois activée, les ramifications se rétractent et, sa morphologie devient amiboïde, ce qui la rend difficilement distinguable avec les macrophages circulants infiltrés.

A l'aide de la technique de cytométrie de flux permettant un tri cellulaire, Campanella *et al* (2002) ont isolé la population microgliale et ont montré une augmentation éminente de ces cellules dans l'hémisphère ipsilatéral de l'ischémie cérébrale contre une stagnation du nombre basal dans l'hémisphère controlatéral.²⁹ La prolifération des cellules microgliales atteint son pic entre 48 et 72 heures et dure plusieurs semaines après le début de l'ischémie dans les modèles animaux et cliniques.^{25,30-32}

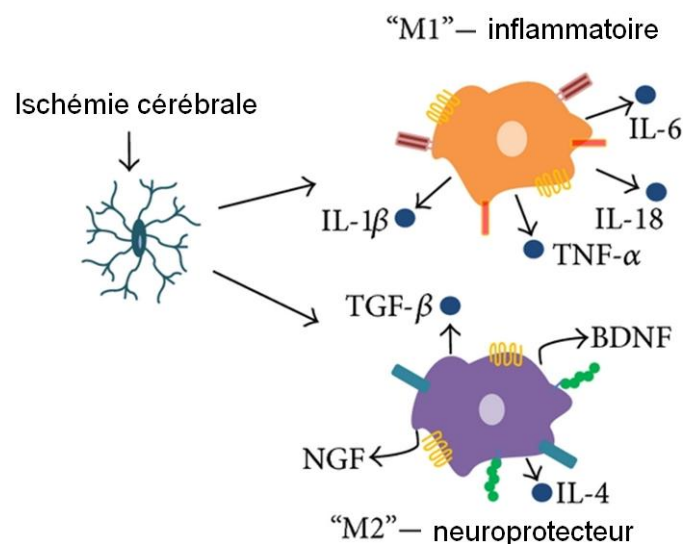


Figure 3 : Polarisation de la microglie. L'ischémie cérébrale active la microglie quiescente et ramifiée. Celle-ci peut prendre le phénotype classique « M1 » ou dit inflammatoire, ou le phénotype dérivé « M2 » ou dit neuroprotecteur. BDNF: brain derived neurotrophic factor; IL: interleukine; NGF: nerve growth factor; TNF: tumor necrosis factor; TGF: transforming growth factor (d'après ³³).

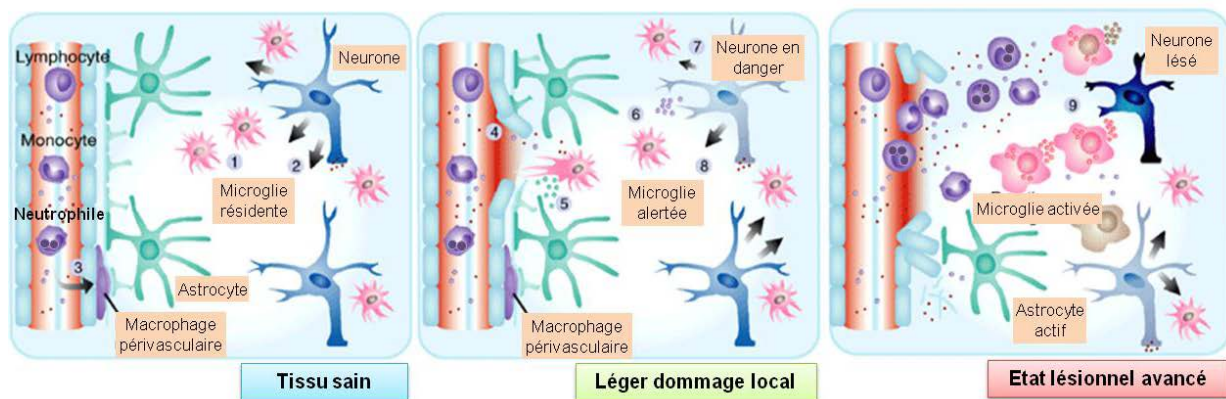


Figure 4 : Activation de la microglie. À gauche, les cellules microgliales dans les tissus normaux sont en activité de surveillance de la présence d'agents inducteurs(1). Les neurones peuvent également délivrer des signaux qui maintiennent la microglie dans ce mode de surveillance, indiquant le fonctionnement normal (2). Outre les microglies du parenchyme, il existe également des macrophages périvasculaires en association étroite avec les vaisseaux sanguins (3). Lors de la détection des premières perturbations homéostatiques, comme des dommages tissulaires légers, la microglie peut répondre rapidement avec un changement dans le profil d'activité et dans leur niveau de ramifications (4). La réponse est probablement prise en charge par les astrocytes voisins, par le relargage de ligands pour les récepteurs purinergiques (5). La microglie peut produire des facteurs neurotrophiques pour soutenir les neurones en survie (6). Les signaux des neurones permettant de garder les microglies en état de quiescence/surveillance sont stoppés ce qui permet d'émettre un signal de danger à la microglie (7). Ces neurones peuvent également émettre des signaux indiquant des fonctions perturbées en libérant des molécules qui ne sont pas habituellement relarguées ou le sont en quantité anormale (8). Les cellules microgliales peuvent être en mesure de limiter les dommages et de restaurer l'homéostasie normale. Alors qu'une activation transitoire n'a aucun impact sur le phénotype microglial, un dommage intense peut déclencher des changements plus drastiques dans le phénotype fonctionnel de la microglie. En fonction de la nature et du contexte du stimulus, les cellules microgliales ont besoin d'acquérir et d'adopter le comportement actif. Cela peut conduire à une dégradation substantielle des neurones et des cellules gliales (9). L'absence de protection et une contribution active à des cascades dommageables ont été attribuées à la microglie activée dans de nombreux scénarios pathologiques. Toutefois, ces données sous-estiment probablement la capacité de la microglie à sauvegarder et à stabiliser le système nerveux central (d'après ³⁴).

B. Polynucléaires neutrophiles

i. Origine et rôle des polynucléaires neutrophiles

Les PNN sont le premier sous-type de cellules leucocytaires recrutées lors d'une réaction inflammatoire. Ce sont des cellules de l'immunité innée qui forment la première défense contre les agents infectieux. Ils proviennent à partir de cellules souches hématopoïétiques pluripotentes qui se transforment en progéniteurs myéloïdes dans la moelle osseuse. Une fois mature, ils peuvent rester quatre à six jours dans la moelle osseuse pour constituer une

réserve. La demi-vie des PNN dans le sang est très courte, jusqu'à six heures chez le rat et huit heures chez l'homme.^{35,36} Ils meurent par apoptose et sont éliminés par les macrophages résidents. Dans le cas d'une ischémie cérébrale, les PNN peuvent être efficaces durant plusieurs jours et mourir de leur propre libération de particules cytotoxiques extracellulaires.³⁷ La hausse des PNN après l'ischémie cérébrale provient des sites de production ou de stockage, la moelle osseuse et la rate, et de la réduction de leur apoptose.³⁸

Les PNN ont pour rôle d'éliminer les agents pathogènes ou les tissus endommagés grâce à l'activité de leurs enzymes protéolytiques, contenues dans ces nombreux granules lysosomiaux cytoplasmiques, parmi lesquelles figurent notamment la xantine deshydrogénase et oxydase, la cyclo-oxygénase, la NADPH oxydase, la myelopéroxydase (MPO) et la monoamine oxydase. Quand les PNN sont activés, ils sont capables de produire des médiateurs inflammatoires, comme des cytokines, des chémokines ou des protéases (figure 5). Des études ont récemment mis en lumière la capacité des PNN à polariser du phénotype N1 « pro-inflammatoire » vers un phénotype N2 « anti-inflammatoire ».³⁹ Une reprogrammation des PNN peut s'opérer par l'activation du récepteur nucléaire *peroxisome proliferator-activated receptors-γ* (PPAR-γ).³⁹ En plus de son rôle initial d'élimination des déchets endogènes, les PNN peuvent participer à la neurorégénération, notamment par la modulation positive du recrutement de cellules immunitaires bénéfiques telles que les cellules B régulatrices ou par la production de médiateurs anti-inflammatoires.^{40,41}

ii. Recrutement et infiltration temporels des polynucléaires neutrophiles

Dans d'autres pathologies, les PNN sont attirés dans la zone infectée ou touchée par un traumatisme grâce un gradient de concentrations de facteurs chimiotaxiques libérés notamment par les microglies activées. Dans un contexte ischémique au niveau du système nerveux central, un amas de PNN se forme au niveau du site de l'occlusion. Leur action majeure se situe au sein du parenchyme en alerte. Un mécanisme d'infiltration se met alors en place afin de leur frayer le passage jusqu'au site d'intérêt (figure 5).

Chaque étape de la diapédèse des PNN est essentielle à leur passage à travers la barrière hémato-encéphalique (BHE). Dès quinze minutes après le début de l'infarctus, les PNN expriment à leur surface des molécules d'adhésion, permettant leur capture au niveau de l'endothélium proche des lésions ischémiques. Par exemple, les molécules d'adhésion suivantes, *P-selectin glycoprotein ligand-1* (PSGL-1) et *macrophage-1 antigen* (MAC-1), se lient aux ligands exprimés à la surface des cellules endothéliales, respectivement à la sélectine de type P et à l'*intercellular adhesion molecule-1* (ICAM-1) (figure 5). Le roulement et l'adhésion des PNN se déroulent deux heures après leur capture.²⁰ Les premiers PNN

migrent dans le parenchyme du cerveau dès trois à huit heures après l'ischémie cérébrale focale, suivis par les monocytes/macrophages et les lymphocytes quelques jours après l'infarctus. L'ensemble participerait à l'aggravation des dommages cérébraux.²⁰ En effet, les premières cellules circulantes inflammatoires ayant subi des changements de profil génique sont les PNN de patients ayant une ischémie cérébrale, dès trois heures après le début des symptômes.⁴² Le pic d'infiltration des PNN se situe entre 24 et 48 heures (figure 6).^{43,44} L'infiltration diminue par la suite, mais se poursuit jusqu'à 7 à 15 jours après l'ischémie cérébrale.⁴⁵

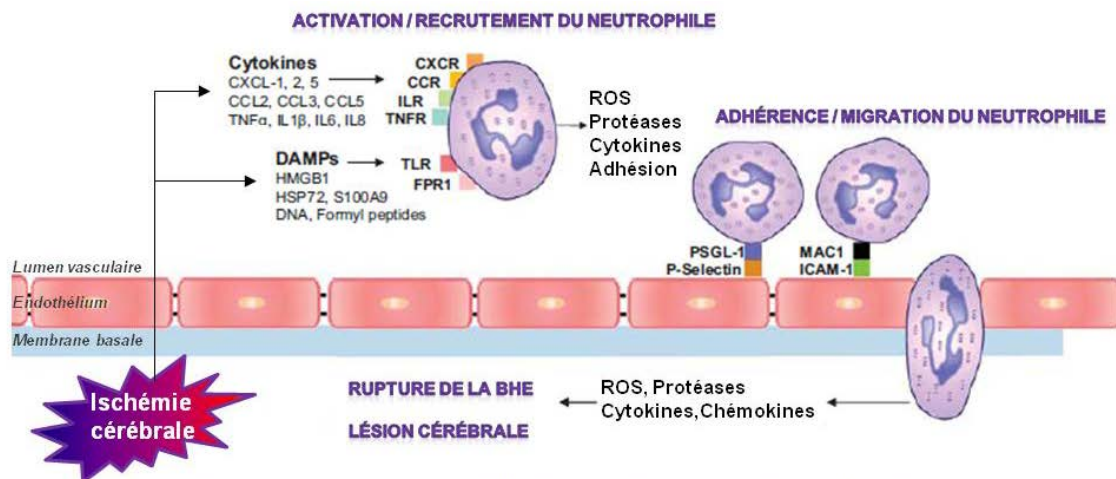


Figure 5 : Activation et adhésion des polynucléaires neutrophiles (PNN) lors de l'ischémie cérébrale. Après une lésion ischémique, un certain nombre de DAMPs et de cytokines sont libérés. Ceux-ci favorisent le recrutement et l'activation des PNN, la libération d'espèces réactives de l'oxygène, de protéases, de cytokines et de chémokines. Les PNN adhèrent au niveau de l'endothélium activé via des molécules d'adhésion qui favorisent les interactions PNN-endothélium et la migration des PNN à travers la BHE jusqu'au parenchyme cérébral. BHE : barrière hémato-encéphalique ; CXCL: CXC-chemokine ligand; CCR: CC-chemokine receptor; CXCR: CXC chemokine receptor; DAMPs: damage-associated molecular patterns; IL: interleukine; ILR: interleukin receptor; FPR: formyl peptide receptor; HMGB1: high mobility group box 1; HSP72: heat-shock protein 72; ICAM-1: intracellular adhesion molecule-1; MAC-1: macrophage 1 antigen; MMP-9: matrix metalloproteinase 9; PSGL-1: P-selectin glycoprotein ligand-1; TLR: toll-like receptor; TNF: tumor necrosis factor (d'après ⁴¹).

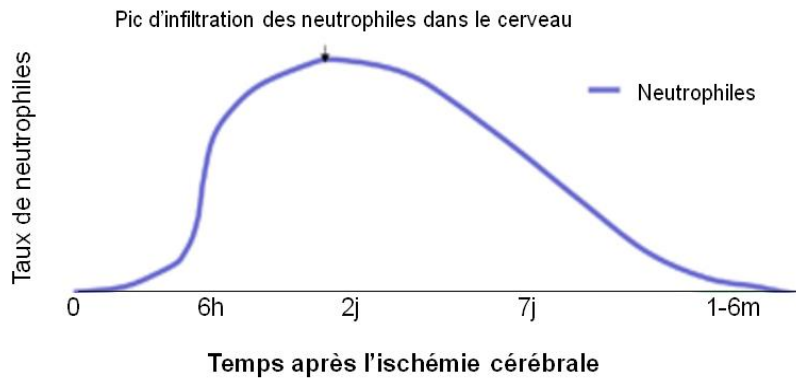


Figure 6 : Recrutement des polynucléaires neutrophiles dans le cerveau en fonction du temps après une ischémie cérébrale (d'après ⁴¹). h : heure ; j : jour ; m : mois.

3. Choix du modèle pré-clinique d'ischémie cérébrale pour l'étude des cellules inflammatoires périphériques

Les modèles expérimentaux constituent un réel tremplin pour l'amélioration du traitement préventif ou curatif des AVC grâce à la compréhension de la physiopathologie des maladies vasculaires cérébrales. Les modèles de l'occlusion de l'artère cérébrale moyenne (OACM) droite transitoire chez le rat ou chez la souris ont remplacé progressivement les modèles d'arrêt permanent du DSC, puisqu'il permet de mieux imiter l'évolution de la physiopathologie de l'ischémie cérébrale chez l'homme. L'occlusion du vaisseau chez l'homme est rarement permanente, grâce notamment à l'instauration du traitement rt-PA. D'autre part, l'aire cérébrale irriguée par l'artère cérébrale moyenne (ACM) est souvent touchée par l'ischémie cérébrale chez l'homme²⁰. Le rat et la souris sont les deux espèces les plus utilisées pour leurs similitudes pathogéniques avec l'homme et leur facilité d'emploi. C'est pourquoi la plupart des études expérimentales sur le recrutement des leucocytes et des lésions cérébrales ischémiques sont réalisées principalement avec des modèles transitoires d'ischémie cérébrale et de reperfusion (IR) chez le rat ou la souris⁴⁶. Il existe trois types d'OACM transitoire : intraluminal avec un fil occlusif, injection d'un vasoconstricteur puissant (endothéline 1), thromboembolique (injection d'un thrombus, ou de thrombine), ou photoembolique (rose bengale). Le modèle d'OACM transitoire est aujourd'hui reconnu pour sa faisabilité, et sa reproductibilité.

Prestigiacomo *et al* (1999) ont montré que le recrutement des PNN contribuait aux dommages d'une ischémie cérébrale avec l'induction d'une reperfusion, ce qui n'a pas été démontré dans le cerveau des animaux ischémiés non reperfusés.⁴⁷ Une autre étude menée par Zhang *et al* (1995), a révélé la forte implication des protéines d'adhésion ICAM-1, qui ont

un rôle primordial dans le recrutement des leucocytes dans l'ischémie cérébrale puisque son inhibition conduit à une réduction des lésions ischémiques uniquement chez les rats ayant eu une reperfusion au bout de 60 minutes d'arrêt du DSC.⁴⁸ Ces deux investigations ont permis de noter un grand nombre de leucocytes infiltrés dans la partie ischémisée du cerveau des animaux IR, ce qui n'a pas été observé dans celle des animaux non reperfusés bien qu'il y ait eu l'induction du roulement et de l'adhésion des leucocytes sur les veinules.

4. Impact de la microglie et des polynucléaires neutrophiles sur la sévérité de l'ischémie cérébrale

L'ischémie cérébrale transitoire conduit à un recrutement des cellules inflammatoires, mécanismes dépendants du temps. Les cellules microgliales et les PNN participent à la sévérité de l'ischémie cérébrale. Leurs inhibitions diminuent la taille de l'infarctus et améliorent les déficits neurologiques dans des modèles expérimentales d'AVC.^{20,22,25} Les multiples constats des effets bénéfiques des traitements anti-inflammatoires chez l'animal ont abouti à quelques essais cliniques. Cependant, les études cliniques engagées dans cette voie thérapeutique n'ont pas été achevées ou ne sont pas parvenues à des résultats significativement positifs au niveau des déficits neurologiques chez les patients ayant subi une ischémie cérébrale.

A. Impact de la microglie sur la sévérité de l'ischémie cérébrale

i. Rôle de la microglie dans la sévérité de l'ischémie cérébrale

La microglie, cellule inflammatoire résidente du cerveau, joue un rôle clé dans l'installation précoce des lésions ischémiques. De multiples études ont suggéré une association entre la sévérité de l'ischémie cérébrale et l'activation des cellules microgliales.^{25,30–33,49–51} L'évolution de l'activation des cellules microgliales a été suivie dans les zones infarctées, corticale et sous-corticale, à l'aide de la technique d'imagerie de tomographie d'émission de protons (TEP) du radiomarqueur [¹¹C]PK11195.^{52–54} Radlinska *et al* (2009) ont associé l'étendue de la microglie radiomarquée à la taille de l'infarctus cérébral et à la sévérité des déficits neurologiques des patients.⁵³

La microglie a des propriétés neurotoxiques dans l'ischémie cérébrale puisqu'elle génère des ROS, comme l'oxyde nitrique synthase inductible (iNOS) via la NADPH oxydase, et des facteurs pro-inflammatoires, comme l'interleukine-1 β (IL-1 β), IL-18, du facteur de nécrose tumorale (TNF), du *monocyte chemoattractant protein-1* (MCP-1) et de la métalloprotéinase de la matrice 9 (MMP-9).^{33,50,55,56} Ces sécrétions initient l'infiltration des leucocytes et la

diminution de la perméabilité de la barrière hémato-encéphalique (BHE). Ces actions sont conférées à la microglie de phénotype M1 dit phénotype classique. En plus de son rôle initial dans l'élimination des débris cellulaires et les excès d'excitotoxines, la microglie de type M2 a un rôle dans la neuroprotection avec l'activité de l'arginase et la sécrétion de facteurs neurotrophiques tels que le facteur neurotrophique dérivé du cerveau (BDNF), le facteur de croissance transformant-1 beta (TGF-1 β) et le facteur de croissance des nerfs (NGF).⁵⁷⁻⁵⁹ La distinction phénotypique attribue à la microglie une implication ambivalente dans l'ischémie cérébrale, à la fois toxique puisqu'elle est associée à une activité pro-inflammatoire via les sécrétions de facteurs neurotoxiques, ou à une activité bénéfique à des stades plus tardifs de l'ischémie cérébrale.^{49,58}

ii. Modulation de l'activation microgliale

La modulation post-ischémique de la microglie par un agent inhibiteur ou par le blocage de médiateurs de l'activation de la microglie (DAMPs ou TLR) a été envisagée afin de réduire les lésions ischémiques. Des investigations expérimentales ont principalement utilisé la minocycline, tétracycline de deuxième génération. L'inhibition de la microglie par la minocycline s'est avérée probante dans un contexte d'ischémie cérébrale expérimentale.^{49,60,61} En effet, Yenari *et al* (2006) ont utilisé cette molécule, sur un modèle cellulaire de sevrage d'oxygène et de glucose, et un modèle animal d'ischémie cérébrale. La réduction de la mort cellulaire *in vitro* et la réduction du volume de l'infarctus accompagnée d'une diminution des déficits neurologiques *in vivo*, par ce traitement, sont expliquées par l'amélioration de la viabilité et de l'intégrité de la BHE.⁴⁹ Toutefois, le dosage du traitement à la minocycline est crucial car à fortes doses, cet antibiotique peut être toxique pour les neurones ou les astrocytes, d'autant plus qu'il n'est pas spécifique aux cellules microgliales.⁶² Aucun traitement ciblant l'inhibition spécifique de la microglie n'a été réalisé chez l'homme.

Le blocage des DAMPs tels que le *high-mobility group box 1* (HMGB-1) et la peroxiredoxine-6 sont des cibles thérapeutiques intéressantes pour inhiber l'activation microgliale et ainsi réduire les lésions ischémiques.⁶³ Par exemple, le traitement à l'anticorps anti-HMGB-1 dans un modèle d'OACM chez le rat a montré une inhibition de l'activation microgliale accompagnée d'une diminution de la taille de l'infarctus.⁶⁴ Le blocage des protéines transmembranaires TLR-4 exprimées à la surface de la microglie, a été également testé par Caso *et al*. Pour ce modèle, les souris étaient déficientes en TLR-4. Elles présentaient des infarctus cérébraux moins sévères et une atténuation de la réponse inflammatoire, comparées aux souris wild type.^{65,66} Dans une cohorte de 110 patients admis pour une ischémie cérébrale, le taux de TLR-4 était associé significativement au volume

lésionnel.⁶⁷ Les DAMPs et les TLRs constituent donc des cibles thérapeutiques potentielles à développer dans des essais cliniques.

L'identification des médiateurs spécifiques de l'activation de la microglie phénotype « bénéfique » ou M2 fait l'objet de recherches récentes dans le domaine dans le but d'amoindrir les dégâts tissulaires via leur stimulation.⁸ A titre d'exemple, l'étude récente de souris transgéniques déficientes en galectine 3, exprimée dans la microglie activée, a montré une prolifération défectueuse de la microglie et l'exacerbation des dommages ischémiques menée par une apoptose neuronale accrue.⁶⁸ La potentialisation de cette galectine pourrait être un moyen de contrebalancer la détérioration tissulaire au sein de la zone cérébrale infarctée puisqu'elle semble être essentielle à la microglie au phénotype « bénéfique ».

B. Impact des polynucléaires neutrophiles sur la sévérité de l'ischémie cérébrale

i. Rôle des polynucléaires neutrophiles dans la sévérité de l'ischémie cérébrale

Le lien entre la sévérité de l'ischémie cérébrale et le taux de PNN dans la zone lésée ou dans le plasma des sujets, a été décrit dans de multiples études cliniques et expérimentales. Par exemple, Buck *et al* (2008) ont collecté les données de volume lésionnel par IRM-DWI, de 173 patients inclus dans les 24 heures après le début de l'ischémie cérébrale. Il ont trouvé que les taux de leucocytes périphériques et les taux de PNN étaient associés à des volumes plus élevés des tissus ischémiés.⁶⁹ Le degré d'infiltration des PNN radio-marqués dans le cerveau ischémique de patients, mesuré par la TEP, était associé à la sévérité des déficits neurologiques.^{45,70} Dans des modèles animaux déficients en PNN, la taille de l'infarctus cérébral était significativement réduite, en comparaison de celle des animaux ischémiés non déficients.^{25,71} La neutropénie pharmacologique, induite par l'injection i.v. de vinblastine ou l'injection intra-péritoniale (i.p.) de l'anticorps RP-3, chez des rats ayant eu une OACM de 24 heures, permettait de réduire le volume infarcté dans le cerveau, notamment grâce à la protection de la fonction endothéliale de l'artère occluse.⁷²

La majoration des lésions ischémiques serait liée à l'accumulation des PNN dans le tissu touché et à leur activité cytotoxique. Le cocktail d'enzymes contenues dans leurs granules génère des ions superoxydes (par l'activité de la xantine deshydrogénase et oxydase, la cyclo-oxygénase et la NADPH oxydase), de l'acide hypochloreux et du peroxyde d'hydrogène (par l'activité de la myéloperoxydase et la monoamine oxydase). Les PNN ont la capacité de libérer des médiateurs neurotoxiques dont des purines, la β -amyloïde, la

protéine HMGB-1, des complexes d'ARN ou d'ADN codant pour des médiateurs pro-inflammatoires.⁷³

Dans l'infarctus cérébral, les PNN favorisent la formation de thrombose par leur interaction avec les plaquettes, le clivage protéolytique des facteurs de coagulation, et la libération de molécules pro-thrombotiques.^{74,75} Ils concourent également à l'athérosclérose et à la rupture de la plaque en améliorant l'infiltration des leucocytes, la production de lipoprotéines de basse densité (LDL) oxydées et la dégradation de la fibrose par leurs enzymes protéolytiques. Ils ont une action pro-inflammatoire en phase aigüe de l'ischémie cérébrale par la libération de divers médiateurs. Dans la phase sub-aigüe de l'ischémie cérébrale, les PNN libèrent des cytokines (IL-1 β , IL-6, IL-6, TNF), des chémokines (MCP-1/CCL-2, MIP-1 α /CCL-3, *regulated on activation normal T cell expressed and secreted* (RANTES/CCL-5)), des protéases (MMP dont MMP-2 et MMP-9 principalement, protéinase 3, élastase, cathepsine G) et des ROS (superoxyde, acide hypochloreux). Ces sécrétions aboutissent à la rupture de la BHE, à la facilitation de l'infiltration des cellules immunitaires circulantes et à la mort des cellules cérébrales.^{49,76-79} Cela concourt également à un œdème cérébral, et possiblement à des transformations hémorragiques.⁸⁰ Ces effets pro-inflammatoires sont récemment conférés aux PNN du type N1.

La majeure partie des facteurs liés à l'activité des PNN semble conduire à une majoration de l'inflammation post-ischémique et à la mort neuronale à des stades précoces de l'ischémie cérébrale. Les stratégies de traitements administrés en vue de réduire les dommages ischémiques via l'inhibition des PNN sont nombreuses. Elles incluent le blocage des facteurs activateurs des PNN (TNF, IL-1 β), des acteurs de la diapédèse (protéines d'adhésion) ou des facteurs concourant à la rupture de la BHE.

ii. Modulation des facteurs associés à l'activation et au recrutement des polynucléaires neutrophiles

Le facteur TNF et l'interleukine IL-1 β contribuent à l'activation des PNN et augmentent lors d'un infarctus cérébral. L'utilisation d'un antagoniste des récepteurs IL-1 dans les modèles animaux conduit à une diminution de l'infiltration des cellules immunitaires périphériques dont les PNN dans le cerveau, à des réductions du volume de l'infarctus, de l'œdème cérébral et de l'activation microgliale, et à une amélioration des déficits fonctionnels.⁸¹ Chez des patients ayant eu une ischémie cérébrale, l'injection i.v. de cet antagoniste a également diminué le taux de PNN dans le sang et a permis d'améliorer les déficits fonctionnels trois mois après l'AVC.⁸² Il a été démontré que le TNF est un médiateur toxique dans les modèles animaux IR et chez les patients ayant eu une ischémie cérébrale.

Cela est notamment dû à une défaillance de la fonction microgliale et une réduction de l'infiltration des PNN.^{51,83,84} Ces deux cytokines sont pléiotropes et agissent sur de nombreux types de cellules. Si leurs effets sur les PNN (et la microglie) sont bien connus, ceux sur les autres types cellulaires sont encore à approfondir.

iii. Modulation des facteurs associés à l'adhésion des polynucléaires neutrophiles sur les cellules endothéliales

L'adhésion des PNN est une étape cruciale de l'inflammation post-ischémique dans le cerveau. Les cibles sont donc les molécules d'adhésion intervenant dans l'adhésion des PNN : ICAM-1, VCAM-1, MAC-1, sélectines E et P.

Les taux de protéines d'adhésion leucocytaire, telles que les CAM solubles, dans le plasma ou le liquide céphalo-rachidien sont élevés dans la phase aigüe de l'ischémie cérébrale et, sont associés à la sévérité de l'infarctus et aux déficits neurologiques et fonctionnels chez des patients ayant eu une ischémie cérébrale comparés à des personnes saines.⁸⁵⁻⁸⁸ Parmi ces études, Wang *et al* (2006) ont montré une relation croissante entre les taux sériques d'ICAM-1 soluble à l'admission et les déficits neurologiques, évalués par le NIHSS, dans une cohorte de 238 patients avec une ischémie cérébrale.⁸⁸ Le blocage par des anticorps anti-ICAM-1 (1A29) conduit à des réductions du volume de la lésion chez des rats ayant eu une OACM transitoire, dans deux études de Zhang *et al*, réduction de 41% pour la première étude et de 44% dans la deuxième.^{48,89} La première étude a d'ailleurs été corrélée à une diminution du nombre de PNN infiltrés dans le cortex infarci.⁸⁹ La déplétion d'ICAM-1 par l'utilisation d'un modèle murin knock-out ICAM-1 a également montré une réduction de l'expansion de l'infarctus cérébral.⁹⁰ Ces études ont révélé que seuls les modèles d'ischémie cérébrale transitoire présentaient un effet bénéfique. Ces résultats encourageants ne sont pas confirmés chez l'homme. En effet, l'utilisation du 1A29 dans l'essai clinique Enlimomab a conduit à une augmentation de mortalité et à des infections chez les patients, 90 jours après le début du traitement. Or, il est aujourd'hui reconnu que les infections sont néfastes sur la sévérité et l'évolution des déficits neurologiques de l'ischémie cérébrale.⁹¹ Le blocage de ces glycoprotéines n'induit pas uniquement un dysfonctionnement de l'infiltration des PNN, mais également celui des autres leucocytes impliqués dans les mécanismes de défense et dans les mécanismes de réparation cérébrale suite aux dommages ischémiques. Si ce traitement a fonctionné chez les animaux de manière homogène, l'hétérogénéité des profils entre chaque patient doit certainement contribuer à l'échec thérapeutique clinique.

L'intégrine MAC-1 ou CD11b/CD18 facilite l'adhésion, la diapédèse et la phagocytose des PNN. Les modèles de knock-out et de blocage par l'anticorps dirigé contre cette

intégrine entraînent une réduction du profil lésionnel dans les modèles expérimentaux d'IR.^{92,93} De manière intéressante, la combinaison du traitement rt-PA avec le traitement UK-279,276, antagoniste sélectif du MAC-1, à des délais d'étude courts (deux à quatre heures), confère un effet synergique dans l'amélioration des déficits neurologiques fonctionnels chez des rats wistar ayant eu une OACM.⁹⁴ Elle permet d'ouvrir la fenêtre thérapeutique du rt-PA, puisqu'à quatre heures d'occlusion, le volume moyen de l'infarctus est certes plus élevé qu'à deux heures, mais reste significativement inférieur à celui des rats traités aux rt-PA seul et aux rats non traités.⁹⁴ Deux essais cliniques ont vu le jour : la cohorte ASTIN composée de 966 patients et la cohorte LeukArrest.⁹⁵ Bien que le traitement UK-279,276 ait été bien toléré par les patients de la première cohorte (aucune augmentation d'incidence d'infections), l'étude n'a pas montré de récupération des déficits neurologiques mesurés par le score *scandinave stroke scale* ajusté.⁹⁶ Pour espérer une efficacité du traitement, le délai d'administration devrait être corrélé à la cinétique d'expression des protéines d'adhésion soit à environ 15 minutes après le début des symptômes. Or, il est quasiment impossible d'inclure des patients aussi précocement. La cohorte LeukArrest, faisant écho à l'étude préclinique de Yenari *et al* (1998), a été arrêtée au cours de la phase III.

Les deux sélectines E et P sont exprimées à la surface des cellules endothéliales et ont un rôle primordial dans l'événement ischémique par leur interaction avec le récepteur PSGL-1. Le blocage d'une de ces sélectines par un traitement à l'anticorps monoclonal ou l'utilisation d'un modèle murin knock-out provoque une amélioration du profil lésionnel et une récupération fonctionnelle, souvent accompagnées d'une infiltration des PNN réduite.⁹⁷⁻⁹⁹ Les plaquettes participent au recrutement des PNN grâce à leur interaction via le PSGL-1.¹⁰⁰ C'est pourquoi cette cible thérapeutique est intéressante. Une récente étude a utilisé un modèle permanent d'OACM et a montré que le blocage de la PSGL-1 réduit significativement l'occlusion des microvaisseaux.¹⁰¹ Les études expérimentales pourtant probantes, n'ont encore pas débouché sur un essai clinique.

iv. Modulation des facteurs associés à la rupture de la BHE

La perte de perméabilité de la BHE participe à l'inflammation post-ischémique, et concourt à de l'œdème, et parfois, à des transformations hémorragiques. Les PNN en sont en partie la cause, puisqu'ils libèrent des enzymes telles que des MMPs, l'élastase, la protéinase 3, et la cathepsine G, et des ROS. L'inhibition des PNN induit la diminution de la rupture de la BHE et participe ainsi indirectement à la prévention du développement d'hémorragies post-ischémiques.

La dégranulation des PNN libère également des MMP-9, ce qui est associé à la sévérité de l'ischémie cérébrale.⁸³ La production et la libération de MMP-9 se fait entre deux et six heures après l'ischémie cérébrale. Son taux sérique chez des patients ayant eu une ischémie cérébrale est corrélé significativement à la rupture de la BHE et au risque de transformations hémorragiques.¹⁰² Gidday *et al* (2005) ont montré que des souris knock-out MMP-9 entraînent une meilleure perméabilité de la BHE, une infiltration atténuée des PNN dans le parenchyme cérébral et une neuroprotection au niveau des lésions ischémiques.¹⁰³

L'élastase contenue dans les granules des PNN a pour action de dégrader la lamine basale et la matrice extracellulaire. L'élastase des PNN semble être également impliquée dans le profil lésionnel des IR.^{104,105} De la même manière que pour les autres enzymes issues des PNN, l'efficacité de l'utilisation d'une inhibition pharmacologique de l'élastase est vérifiée pour le traitement des infarctus cérébraux dans les modèles animaux. A titre d'exemple, le sivelestat, inhibiteur sélectif de l'élastase issue des PNN, induit une neutropénie et améliore la perméabilité de la BHE, l'œdème cérébral et les déficits neurologiques dans un modèle murin d'ischémie cérébrale focale.¹⁰⁶

Les ROS libérés par les PNN provoquent la mort des cellules de l'unité neuro-vasculaire, notamment des cellules endothéliales, des cellules musculaires lisses, des astrocytes et des péricytes. L'ensemble favorise la destruction de la BHE, les transformations hémorragiques et l'œdème cérébral. L'inhibition de la nicotinamide adenine dinucleotide phosphate oxydase (NOX-2) par l'apocynine ou par sa déplétion génétique est neuroprotectrice dans un contexte expérimental d'ischémie cérébrale.¹⁰⁷ Les PNN dans ces deux modèles se sont infiltrés en plus petit nombre dans la partie ischémisée. Il semblerait que l'exacerbation des dommages dans le cerveau serait induit par la forme cicurlante de la NOX-2 (provenant de la moelle osseuse).¹⁰⁷

L'ablation génétique de l'enzyme NAPDH oxydase, produisant des ions superoxydes, divise par deux les dommages ischémiques chez des souris déficientes en gp91(phox) (sous-unité de l'enzyme) à 24 heures de reperfusion, comparés à des souris wild type.¹⁰⁸

v. Modulation des acteurs liés au phénotype N2 des polynucléaires neutrophiles

Des nouvelles pistes thérapeutiques ont été élaborées, ciblant les médiateurs des PNN au phénotype « bénéfique ». Cuartero *et al* (2013) ont mis en évidence la reprogrammation du phénotype N2 des PNN par l'activation des récepteurs PPAR- γ .³⁹ Un traitement à l'agoniste de ce récepteur, la rosiglitazone, permet une hausse de 77% de l'acquisition du

phénotype N2 pour les PNN, accompagné d'une clairance plus efficace des PNN et d'une réduction du volume de l'infarctus cérébral chez les souris IR.³⁹

La contribution des PNN et de la microglie dans le développement de l'infarctus cérébral est indéniable et a été le sujet de nombreuses publications. Si leur participation dans la phase aigüe de l'ischémie cérébrale n'est pas remise en question, leur action est controversée.¹⁰⁹ Les rôles dualistes de la microglie et des PNN sur l'évolution temporelle des lésions tissulaires sont à prendre en considération.⁴³ L'hétérogénéité des profils cliniques et la complexité des mécanismes sous-jacents à l'inflammation post-ischémique, tels que le facteur temps dans le recrutement et l'activation de la microglie ou des PNN, sont à approfondir afin de mieux appréhender les cas cliniques d'ischémie cérébrale. Les échecs thérapeutiques mettent en évidence le fossé entre les études pré-cliniques et cliniques. La recherche translationnelle a besoin d'être reconsidérée. Les investigations expérimentales portant sur le rôle des facteurs influençant l'inflammation post-ischémique et donc la sévérité de l'ischémie cérébrale chez les patients, tels que les comorbidités, sont encore rares et méritent d'être approfondies.

5. Impact des comorbidités sur l'ischémie cérébrale: rôle de la microglie et des polynucléaires neutrophiles

Les principales comorbidités de l'AVC sont l'athérosclérose, l'hyperlipidémie, les diabètes, l'obésité, l'hypertension et les infections. Des études cliniques et épidémiologiques ont clairement établi qu'une infection systémique de type viral ou bactérien augmente le risque d'ischémie cérébrale.^{110,111} Ces observations sont vérifiées dans les principales comorbidités.¹¹² La présence de facteurs associés à une inflammation systémique chez des patients ayant eu une ischémie cérébrale est corrélée positivement aux déficits neurologiques plus sévères.^{14,91,113,114} Dans les modèles animaux d'ischémie cérébrale, l'hypertension, le diabète, l'obésité, l'athérosclérose et l'infection augmentent les dommages cérébraux.²² La modulation du profil lésionnel par ces facteurs s'explique notamment par la présence préalable d'une inflammation systémique.²⁴ Le blocage des voies inflammatoires dans les modèles expérimentaux associant une comorbidité et l'ischémie cérébrale, protège le cerveau des lésions ischémiques, ce qui sous-tend que la charge inflammatoire préexistante produite par les comorbidités contribue à la majoration de l'inflammation post-ischémique et prédispose le cerveau à avoir un profil lésionnel plus important.^{112,115,116} Parmi ces voies inflammatoires, le système de l'immunité innée, mené notamment par l'activation de la microglie et le recrutement des PNN, constitue une piste de développement

thérapeutique intéressante, pour contrer les effets délétères des comorbidités lors de la survenue d'une ischémie cérébrale.

A. Impact des comorbidités sur la sévérité de l'ischémie cérébrale

Chez l'homme, les événements inflammatoires systémiques peuvent survenir suite à l'installation d'une infection, d'un diabète de type II, d'une athérosclérose, d'une obésité morbide, ou d'une hypertension non traitée. Ces facteurs augmentent le risque de survenue mais également les déficits neurologiques et fonctionnels chez l'homme. Des modèles précliniques complexes, caractérisés par la combinaison de l'induction d'une comorbidité et d'une occlusion artérielle, ont été réalisés dans le but de reproduire les observations cliniques et de comprendre les mécanismes sous-jacents. A titre d'exemple, des équipes de recherche ont utilisé des souris obèses (ob/ob) et ont induit une occlusion artérielle cérébrale pour l'étude de l'impact de l'obésité morbide sur la sévérité de l'infarctus cérébral.¹¹⁷⁻¹¹⁹ Les souris ob/ob développent un infarctus cérébral et des déficits fonctionnels plus sévères, comparés aux souris non obèses.¹¹⁷⁻¹¹⁹ L'utilisation de la souche de rats spontanément hypertendus (SHR) a permis d'étudier l'impact délétère de l'hypertension sur la sévérité de l'ischémie cérébrale.¹²⁰ Des modèles expérimentaux d'ischémie cérébrale ont été couplés à l'administration répétée de lipopolysaccharides (LPS), afin de mimer une inflammation systémique due à une infection. Ces études ont montré une augmentation de l'inflammation post-ischémique et un accroissement des dommages cérébraux.^{121,122} L'injection chronique de la cytokine pro-inflammatoire IL-1 β induit une rupture des composants de la BHE, ce qui a entraîné une élévation de l'étendue des lésions et des déficits neurologiques dans un modèle murin d'OACM.¹¹⁶ Cela prouve l'importance de la considération de la présence d'un terrain inflammatoire lors la survenue d'un infarctus cérébral.

Les mécanismes responsables de cette exacerbation des lésions ischémiques dans un contexte inflammatoire systémique sont complexes et impliquent de nombreux acteurs, comme par exemple, les ROS, les cytokines, ou les protéases.¹²³ Les cellules de l'immunité innée, telles que la microglie ou les PNN, ont également un rôle prépondérant dans la sévérité de l'ischémie cérébrale conférée par une comorbidité inflammatoire.

B. Rôle de la microglie dans un contexte inflammatoire systémique et ischémie cérébrale

Le rôle de la microglie dans l'exacerbation des lésions ischémiques dans un contexte d'inflammation systémique a été décrit dans quelques publications. Parmi ces dernières, Tureyen *et al* (2011) ont évalué l'effet de l'OACM chez des souris adultes db/db, modèle du

diabète de type II.¹¹⁸ Après trois jours de reperfusion sanguine, les souris db/db avaient des infarctus plus volumineux et des déficits neurologiques plus sévères comparés aux souris génétiques contrôles normoglycémiques (db/+). Cela était accompagné de l'augmentation de l'activation microgliale (67%).¹¹⁸

L'impact de l'hypertension sur l'inflammation post-ischémique a notamment été étudié par De Geyter *et al* (2012) avec l'utilisation d'un modèle d'injection d'un vasoconstricteur (endothéline 1) chez des rats SHR. Ils ont montré une augmentation significative du volume de l'infarctus cérébral total, 24 heures après l'induction d'une IR focale, comparée à des rats contrôles wistar kyoto ischémiés. Cette aggravation du profil lésionnel était corrélée à une diminution des cellules immuno-marquées à la molécule adaptatrice liant le calcium ionisant 1 (Iba-1), marqueur de la microglie activée, dans le striatum (24 heures post-ischémie) et le cortex (24 heures et 72 heures post-ischémie).¹²⁴

C. Rôle des polynucléaires neutrophiles dans un contexte inflammatoire systémique et l'ischémie cérébrale

Les PNN, premières cellules périphériques de l'immunité innée recrutées dans l'ischémie cérébrale, ont été étudiés dans quelques modèles de comorbidités/AVC. Il a été décrit que les taux de PNN et de la protéine réactive C (CRP), marqueur de l'inflammation périphérique, étaient plus élevés chez les patients ayant eu une ischémie cérébrale précédée d'une phase d'infection, et étaient corrélés aux déficits neurologiques mesurés avec le score *Scandinivian Stroke Scale*, quatre jours après l'infarctus cérébral.¹¹³

McColl *et al* (2007) ont élaboré un modèle murin d'inflammation systémique, par l'injection de la cytokine pro-inflammatoire, IL-1 β , suivi d'une OACM et mis en évidence l'implication des PNN dans l'aggravation des lésions ischémiques.¹²² La déplétion des PNN par l'injection d'un anticorps anti-PNN ou la déplétion en MMP-9 entraînait une réduction des déficits neurologiques et de la taille de l'infarctus cérébral.^{116,122}

L'étude de Tureyen *et al* (2011) a également associé aux déficits neurologiques dans leur modèle de diabète de type II, une augmentation des capillaires positives à l'ICAM-1, un œdème cérébral plus conséquent et une majoration de la présence des PNN dans le cortex ipsilatéral.¹¹⁸ Un modèle murin d'hyperglycémie/diabète combiné à une IR a permis de montrer une augmentation de l'activité de MMP-9, une mort apoptotique des cellules endothéliales accrue, ce qui est associé à une aggravation des transformations hémorragiques post-ischémiques.¹²⁵

II. Impact de la consommation chronique d'éthanol sur l'immunité innée du cerveau et du foie : rôle des polynucléaires neutrophiles et des macrophages résidents

D'après le rapport d'état mondial concernant l'alcool et la santé effectué par le *World Health Organisation* en 2014, près de 42 sur 100 000 habitants européens (hors Europe de l'est, qui sont à 463 décès pour 100 000 habitants) décèdent d'une maladie attribuable à la consommation d'alcool en 2012.¹²⁶ Les maladies causées par la consommation excessive chronique d'alcool sont multiples : diabète, maladies vasculaires, maladies neurologiques et psychiatriques, AVC, maladies hépatiques, cancers...¹²⁶ L'Europe compte la plus grande proportion de consommateurs courants d'alcool (66,4%) alors que le pourcentage moyen mondial de consommateurs est de 38,3%.¹²⁶ Cette variabilité géographique s'explique par les divergences culturelles et ainsi les habitudes de consommation d'éthanol qui en résultent.¹²⁷ Parmi ces consommateurs d'alcool, un sous-ensemble de buveurs excessifs consomme des quantités importantes, plus de 40 g d'éthanol pur par jour (4 verres quotidiennement). Ils peuvent développer une tolérance physique et une dépendance à l'éthanol. La capacité de l'éthanol à se diffuser rapidement dans le corps, notamment dans l'organe le plus fragile, le cerveau, confère des troubles comportementaux réversibles dès lors d'une unique prise (perte de mémoire, sédation, irritabilité, agressivité). La consommation chronique d'éthanol devient nocive quand des conséquences sociales et sanitaires négatives, telles que le chômage, le retrait social, la transmission des maladies infectieuses, et des dommages au niveau organique, se mettent en place. Des altérations de la structure, la physiologie et la fonction des organes adviennent irrémissiblement. La consommation excessive et chronique d'éthanol entraîne des états inflammatoires et des lésions irréversibles dans de multiples organes.

1. Pharmacocinétique de l'éthanol

La molécule d'éthanol est absorbée au niveau du tractus supérieur gastro-intestinal (70 à 80% dans le duodénum et le jéjunum) par diffusion simple et, elle est rapidement distribuée dans les organes très vascularisés, comme le foie, les poumons et le cerveau. Le foie a un rôle clé lors d'une intoxication à l'alcool puisque son métabolisme permet d'éliminer plus de 80% de l'éthanol absorbé (le reste étant éliminé par le métabolisme rénal ou celui du tractus gastro-intestinal ou sous sa forme initiale par l'air expiré, les voies urinaires et sudorales). Cependant, quand une quantité massive d'éthanol parvient régulièrement dans le foie, celui-ci est dans l'incapacité d'éliminer correctement toutes les molécules d'acide éthylique et les

métabolites intermédiaires toxiques, ce qui génère des dysfonctionnements parfois irréversibles tels que le développement d'une cirrhose alcoolique. Les recherches du célèbre nutritionniste Charles Saul Lieber ont permis d'établir le fait qu'une consommation excessive et chronique d'alcool peut causer une cirrhose du foie chez des sujets ayant un régime alimentaire correct.¹²⁸ Les molécules d'éthanol passent aisément à travers le BHE et altèrent la neurotransmission.

2. Physiopathologie et progression des lésions hépatiques vers un terrain inflammatoire lors d'une consommation chronique d'éthanol

La consommation chronique d'éthanol induit une défaillance hépatique. Cela se manifeste progressivement par des dysfonctionnements d'abord réversibles, la stéatose, puis plus graves comme la stéatohépatite, ce qui peut progresser en cirrhose ou carcinome hépatocellulaire. Plus de 95% des consommateurs excessifs développent une stéatose hépatique mais seulement 20 à 40% développent une maladie alcoolique du foie caractérisée par une inflammation hépatique.^{129,130} Ces disparités à caractère évolutif observées varient selon les personnes, de par leurs différences dans leurs habitudes liées à la consommation d'éthanol et dans leur susceptibilité à l'effet direct ou indirect à l'éthanol.¹²⁹

A. Métabolisme de l'éthanol dans le foie

L'éthanol est majoritairement éliminé dans les hépatocytes, par deux oxydations successives. La première transforme l'éthanol sous forme d'acétaldéhyde, à l'aide de trois voies enzymatiques, celle de l'alcool déshydrogénase (ADH) au niveau cytosolique, celle du cytochrome P450 2^E1 réalisée dans le système microsomal d'oxydation de l'éthanol au niveau du réticulum endoplasmique et celle de la catalase, qui est moins représentative et située dans les peroxysomes. La deuxième oxydation consiste en la métabolisation de l'acétaldéhyde en acétate par l'aldéhyde déshydrogénase (ALDH). L'acétate est ensuite libéré dans la circulation sanguine et oxydé en CO₂ et H₂O.

B. Conséquences physiopathologiques de l'oxydation de l'éthanol au sein du foie suite à une consommation chronique d'éthanol

Les deux enzymes ADH et ALDH ont pour coenzyme le NAD⁺. La conséquence de l'oxydation de l'éthanol est donc une perturbation de la balance NADH/NAD⁺, ce qui provoque des troubles dans les métabolismes glucidique et lipidique. Le pyruvate se transforme en lactate, ce qui entraîne le ralentissement de la néoglucogenèse et induit une

hypoglycémie. L'hyperlactatémie peut également engendrer, une acidose métabolique et une hyperuricémie associée à un catabolisme élevé de purines par la xanthine oxydase. Le potentiel d'oxydoréduction hépatocytaire en consommant le NAD⁺, entraîne un blocage de la β -oxydation des acides gras nécessaires pour produire de l'ATP. Les acides gras s'accumulent alors principalement sous forme de triglycérides (ainsi que de phospholipides et d'esters de cholestérol) dans les hépatocytes, phénomène appelé stéatose hépatique.¹³¹ A cette première réponse du foie, les dysfonctionnements sont encore bénins et réversibles. Si l'arrêt de ce type de consommation se fait à ce stade, l'autophagie des gouttelettes lipidiques est accrue et, permet au foie de revenir à l'état initial. Fait intéressant, une consommation aiguë d'éthanol stimule l'autophagie des gouttelettes lipidiques, ce qui représente un système compensatoire déployé par le foie au début de la stéatose.¹³² L'intoxication à l'éthanol prolongée inhibe la macro-autophagie et contribue indéniablement à la pathogenèse du foie.¹³³

Le métabolite intermédiaire, l'acétaldéhyde, est très toxique et a un rôle majeur dans l'apparition des lésions hépatiques. Si le mécanisme d'élimination de ce métabolite est dépassé dans le cas d'une consommation excessive et chronique, son accumulation au niveau mitochondriale entraîne une mort cellulaire par une carence des systèmes oxydants (notamment du glutathion réduit), une augmentation de la peroxydation lipidique et les effets toxiques des ROS. La production hépatotoxique de ROS provient de la lipoperoxydation des membranes liée à l'induction de l'activité microsomale du CYP2E1 ou l'oxydation de l'acétylaldéhyde. Plusieurs études expérimentales ont révélé le lien entre le CYP2E1 et la toxicité hépatocellulaire de l'éthanol et la peroxydation lipidique.^{134–136}

Les produits de la peroxydation et l'acétylaldéhyde stimulent la production de collagène par les cellules étoilées du foie, ce qui conduit à une fibrose hépatique périveinulaire, typiquement retrouvée dans le foie de sujets alcooliques atteints de stéatohépatite ou dans un modèle d'alcoolisation chronique chez le babouin.^{137–139}

L'acétylaldéhyde réagit activement avec des protéines plasmatiques, telles que l'albumine, les lipoprotéines ou l'hémoglobine, qui changent leurs propriétés ou forment des adduits retrouvés au niveau du foie ou même du cerveau.¹⁴⁰ Ce type de composé peut conduire à une réaction auto-immune, comme l'hépatite aiguë alcoolique.

C. Biomarqueurs sanguins d'une atteinte hépatique due à la consommation chronique d'éthanol

Une atteinte du foie peut être rapidement détectée grâce aux dosages des enzymes hépatiques. Une atteinte de type toxique, comme l'absorption répétée d'éthanol, augmente les taux plasmatiques de glutalopyruvate transférase (TGP ou ALAT), de glutamoxaloacétate transférase (TGO ou ASAT) et de gamma glutamyl transférase (γ GT).¹⁴¹ Ces enzymes ont pour fonction de transférer les amines dans les processus métaboliques et chimiques dans le milieu intracellulaire. La lyse hépatocytaire induite par les mécanismes décrits dans le paragraphe précédent, libère dans la circulation sanguine les transaminases, dont les TGP et les γ GT majoritairement, enzymes prédominantes dans le foie. L'augmentation de ces enzymes, ne peut pas être imputée qu'à la consommation excessive de boissons alcoolisées. C'est pourquoi un dosage non routinier d'un biomarqueur plus spécifique de la consommation excessive et chronique d'éthanol peut être envisagé. A l'heure actuelle, le meilleur marqueur de la consommation excessive et chronique d'éthanol est la *carbohydrate-deficient transferrin* (CDT).¹⁴² Cette glycoprotéine permet le transport du fer dans l'organisme. La transferrine a différentes isoformes, dont la principale est composée de quatre résidus d'acide sialique. La prise quotidienne d'au moins 50 g d'éthanol modifie la proportion de ces isoformes en inhibant la sialylation et augmente donc la proportion de transferrines pauvres en acide sialique, les CDT. Le taux de CDT se normalise après deux à trois semaines d'abstinence alors que les taux des transaminases se régularisent après deux mois. Le dosage de la CDT est également intéressant pour le suivi de l'abstinence des sujets dépendants.¹⁴³ Les caractéristiques de chacun de ces marqueurs sont répertoriées dans le tableau 2.

Marqueurs biologiques	Avantages	Inconvénients	Seuil
CDT Carbohydate déficient transferrin	Sensibilité de modérée à haute Marqueur de rechute Excellente spécificité Demi-vie de 15 jours	Coût élevé Méthodologie sophistiquée	2,5 %* (proportion en fonction du taux total de transferrines)
γGT Gamma-glutamyl transférase	Sensibilité de modérée à haute Dosage facile Bonne acceptabilité Faible coût	Peu spécifique Mauvais indicateur de rechute Demi vie de 2 mois	50 UI/L
ASAT-TGO Glutamoxaloacétate transférase	Demi-vie de 2 à 3 semaines Dosage facile Bonne acceptabilité Faible coût	Peu spécifique Faible sensibilité	45 UI/L
ALAT-TGP Glutamopyruvate transférase	Demi-vie de 2 à 3 semaines Dosage facile Bonne acceptabilité Faible coût	Peu spécifique Faible sensibilité	50 UI/L
VGM Volume globulaire moyen	Bonne acceptabilité Faible coût	Faible sensibilité (moins sensible chez l'homme) Peu spécifique Demi vie de plusieurs mois	98 μ ³

Tableau 2 : Marqueurs biologiques de la consommation excessive et chronique d'éthanol (d'après ¹⁴⁴) . *d'après la technique de Delanghe et al 2007 ¹⁴².

D. Facteurs modulateurs des lésions liées à la consommation chronique d'éthanol

Les lésions liées à la consommation chronique d'éthanol peuvent se développer et être modulées par une multitude de facteurs parmi lesquels figurent la dose, la durée, le type de la consommation d'alcool, les habitudes de consommation, le sexe et l'origine ethnique.¹⁴⁵⁻¹⁴⁸ En outre, l'obésité, les infections concomitantes, la surcharge en fer, ainsi que l'interaction médicamenteuse avec les molécules d'éthanol peuvent aggraver les dégâts causés par la consommation d'éthanol.¹⁴⁹⁻¹⁵³

Des variations inter-individuelles peuvent être issues d'une différence de métabolisme de l'éthanol. De nombreuses investigations se sont penchées sur le polymorphisme génétique des gènes codant pour les différents acteurs oxydatifs de l'éthanol, en particulier, les variants alléliques des gènes codant pour les enzymes : CYP2E1, ADH et ALDH. Les deux principales iso-enzymes de l'acétylaldéhyde sont ALDH1 et ALDH2.¹⁵⁴ Un polymorphisme génétique a été mis en évidence dans l'ALDH2 selon les ethnies : l'allèle ALDH2*1 représenté chez tous les caucasoïdes, codant pour une enzyme très active et l'allèle mutant ALDH2*2 à caractère dominant chez 50% des asiatiques, codant pour une enzyme

inactive.¹⁵⁵ L'activité enzymatique déficiente entraîne une accumulation d'acétylaldéhyde, qui a pour symptômes une arrivée de sang facial et des signes d'intolérance à l'éthanol (hypotension, brûlures gastriques, maux de tête...). Ces désagréments sont tels qu'ils dissuadent les personnes homozygotes de consommer des boissons alcoolisées. L'allèle c2 de CYP2E1 est présent chez 40% des sujets japonais et est associé à une consommation d'alcool plus importante.¹⁵⁵ Le lien entre le polymorphisme génétique du CYP2E1 et la sévérité de la consommation excessive et chronique d'alcool n'est pas encore clairement établi.

E. Effets directs et indirects de la consommation chronique d'éthanol sur l'inflammation cérébrale et hépatique

Il existe deux sources majeures d'inflammation générées par l'éthanol : celles dérivée des cellules directement endommagées par l'éthanol et celle provenant de la microflore intestinale, en particulier, du LPS.

i. Induction de l'état inflammatoire dans le foie suite à une consommation chronique d'éthanol

Quand la stéatose est associée à un dysfonctionnement des organites, un stress oxydatif et des lésions hépatocellulaires, un état pathologique inflammatoire peut conjointement être déclenché par l'activation de cytokines pro-inflammatoires (effet direct), et/ou par la translocation intestinale anormale d'endotoxines bactériennes (effet indirect).¹⁵⁶ La progression de la stéatohépatite à un état inflammatoire et, surtout à des lésions à un stade où la régénération hépatocellulaire et la réparation sont gravement compromises et où la fibrogenèse commence à dominer, limite encore davantage les fonctions métabolique et homéostatique du foie.¹³¹ La majoration de l'état inflammatoire est également due à l'endotoxémie. Ronald Thurman *et al* ont permis de mettre en lumière le rôle du LPS dans la maladie du foie alcoolique.¹⁵⁷ La consommation chronique d'éthanol perturbe la barrière épithéliale intestinale au niveau des jonctions serrées et stimule la translocation des bactéries et des endotoxines (LPS) provenant de la lumière intestinale.^{158,159} Il a été montré que l'administration intra-gastrique (i.g.) quotidienne de 5g/kg d'éthanol durant quatre semaines a augmenté 15 fois les taux de LPS dans leur plasma, comparés à des rats non alcoolisés.¹⁶⁰ Une endotoxémie est relevée journallement dans le plasma de personnes consommatrices d'alcool.¹⁶¹ Or, le LPS a la faculté de mimer des infections bactériennes, ce qui active la réponse inflammatoire de l'hôte.¹⁶²

ii. Impact de la consommation chronique d'éthanol sur l'immunité innée dans le foie: rôle des polynucléaires neutrophiles

Le système de l'immunité innée permet notamment de réguler l'homéostasie entre la prolifération et l'apoptose des cellules épithéliales de l'intestin mais aussi la régénération du foie après une perte de sa masse. Lors d'une consommation excessive et chronique, ce processus peut être gravement perturbé au niveau des différents composants cellulaires du système.¹⁶³⁻¹⁶⁵ Les effets de la modulation de l'immunité par l'intoxication répétitive à l'éthanol se produisent non seulement chez les individus humains mais aussi, dans des modèles animaux¹⁶⁶⁻¹⁶⁸.

La présence de LPS dans le foie déclenche des réponses immunitaires innées principalement par l'intermédiaire d'une sensibilisation des cellules de Kupffer, conduisant à une inflammation intra-hépatique et à la production de cytokines pro-inflammatoires.^{159,169} A titre d'exemple, l'exposition chronique à l'éthanol augmente la production de TNF dans les cellules de Kupffer de rongeurs, suite à une stimulation par le LPS.^{162,170} Il a été montré que le traitement par un agent toxique sélectif des macrophages résidents, le gadolinium chloride, protégeait des effets néfastes de l'éthanol par une réduction des changements lipidiques, de l'inflammation et de la nécrose dans le foie des rats gavés à l'éthanol durant quatre semaines.¹⁷¹

Les nombreuses cytokines et chémokines produites par les cellules de Kupffer sont régulées à la hausse et favorisent le recrutement des PNN au cours de la progression de l'hépatite alcoolique.^{157,169,172,173} Lemmers *et al* (2009) ont montré que la production d'IL-17 par les macrophages résidents dans le foie de l'homme induisait l'infiltration des PNN mais également la stimulation des cellules étoilées du foie, productrices d'IL-8 et CXCL-1/ GRO- α (C-X-C motif ligand 1 / *melanoma growth stimulating activity* α), ce qui aide au recrutement des PNN.¹⁷⁴ Pour que les PNN s'infiltrent dans le foie, il doit donc y avoir un amorçage de l'inflammation systémique par la production de cytokines, de chémokines, de facteurs du complément et d'autres marqueurs comme le facteur d'activation des plaquettes.^{100,174-176} Les PNN alors activés, s'accumulent dans la microvascularisation du foie et extravasent dans le parenchyme hépatique par un gradient chimiotaxique via l'interaction avec les protéines d'adhésion exprimées à leur surface et à celles des cellules endothéliales hépatiques.^{176,177} L'infiltration de PNN est un marqueur d'hépatite alcoolique qui est associé à la sévérité des lésions chez l'homme et dans des modèles animaux.¹⁷⁸⁻¹⁸⁰

Les PNN génèrent des cytokines pro-inflammatoires, des ROS et des médiateurs cytotoxiques, ce qui induit des dommages hépatocellulaires. Cependant, ils contribuent

également à la régénération hépatique grâce à ces propriétés de digestion des débris nécrotiques au sein du tissu lésé et de production de facteurs de croissance tels que le *hepatocyte growth factor*.^{179,181}

3. Conséquences de la consommation chronique d'éthanol sur le cerveau

Le *National Institute on Alcohol Abuse and Alcoholism* considère l'importance des recherches sur l'éthanol dans le domaine des neurosciences. Depuis 2002, une division spécifique, nommée *Division of Neurosciences and Behavior*, a été formée dans le but d'approfondir le lien entre l'éthanol et le cerveau.¹⁸² Cela montre l'intérêt grandissant pour les études neuroscientifiques dans l'impact de l'éthanol.

A. Dommages cérébraux dus à la consommation chronique d'éthanol

La consommation excessive et chronique d'éthanol conduit à des changements persistants dans le système nerveux central et à des troubles comportementaux, caractérisés par une perte de contrôle, des troubles limbiques négatifs et une intensité croissante de *craving* (envie irrépressible de boire). L'éthanol perturbe les membranaires cellulaires et les structures protéiques au sein du cerveau. Il peut moduler également des canaux ioniques, des enzymes et des récepteurs spécifiques tels que celui de l'acide γ -aminobutyrique A (GABA-A), principale cible de l'éthanol, de la sérotonine, de l'acétylcholine, ou du glutamate. Elle est associée à des altérations de la structure et de la fonction du cerveau, une perte de masse cérébrale et à des effets pouvant aller jusqu'à l'addiction.^{183,184} Le poids du cerveau de personnes consommatrices chroniques d'éthanol est significativement réduit, comparé à celui des personnes non-consommatrices.^{185,186} L'atrophie cérébrale est positivement corrélée à la dose d'éthanol consommée quotidiennement.¹⁸⁶ La consommation excessive et chronique d'alcool infère une réduction du volume du lobe frontal et dans le cas d'un alcoolisme, une perte neuronale importante dans le cervelet, le cortex et l'hypothalamus.¹⁸⁷ Cette réduction touche principalement la matière blanche, ce qui s'expliquerait par une démyélinisation et une diminution du marqueur astrocytaire ainsi qu'une excitotoxicité glutamatergique.^{188–190} Les expériences ont également mis en évidence que la neurodégénérescence induite par la consommation quotidienne à des doses élevées d'éthanol, est due à la potentialisation de la réponse neuro-immune.^{163,191,192}

B. Implication de la neuroimmunité dans l'effet neurotoxique de l'éthanol : rôle de la microglie

La physiopathologie de l'éthanol dans le cerveau est composée de changements neuroinflammatoires impliquant la réponse immunitaire innée.^{193,194} Il a été récemment montré par Crews et Vertreno (2014) que l'expression des gènes codant pour des acteurs de l'immunité innée était augmentée dans différentes zones du cerveau *post-mortem* de sujets consommateurs excessifs d'éthanol.¹⁹² Parmi ces gènes, figurent des marqueurs microgliaux, des cytokines, des DAMPs, des TLR par exemple. *A contrario*, à ce jour, aucune publication n'a mis en évidence l'expression de marqueurs associés à la présence de PNN, cellules immunitaires périphériques, dans le cerveau de sujets alcoolisés.

i. Rôle de la microglie dans la neuro-inflammation et la neurodégénérescence suite à une consommation chronique d'éthanol

La microglie peut être activée par une multitude de drogues, notamment l'éthanol. Des études animales et cliniques ont mis en évidence l'implication de la microglie dans les effets neurotoxiques de l'éthanol.¹⁹⁵ La consommation excessive et chronique d'éthanol est associée à une augmentation du nombre de microglies activées et à la production de médiateurs pro-inflammatoires.^{59,191}

L'expression des acteurs de l'activation de la microglie et l'expression des médiateurs pro-inflammatoires issus de celle-ci, a été corrélée à l'effet neurodégénératif de la microglie chez l'homme et dans des modèles animaux. Des augmentations de l'expression génique du HMGB-1 et des récepteurs TLR-2, TLR-3 et TLR-4 ont été documentées dans le cortex préfrontal dans des sujets alcooliques.¹⁹⁶ Fernandez-Lizarbe *et al* (2013) ont révélé l'association positive entre les TLR-2 et TLR-4 exprimés à la surface des microglies avec la production de médiateurs inflammatoires (TNF et IL-1 β), de ROS et d'une apoptose neuronale accrue.¹⁹⁷

Chez l'homme, des augmentations des taux protéiques de MCP-1 et du marqueur microgliale Iba-1 ont été relevées dans l'aire tegmentale ventrale, l'amygdale, le noyau accumbens et l'hippocampe.¹⁹⁸ Le niveau d'expression génique du marqueur IL-1 β est également augmenté dans l'hippocampe, ce qui pourrait contribuer à la perte de la neurogenèse.¹⁹⁹

La production microgliale des ROS dans le cerveau participe également à la neurotoxicité induite par la consommation excessive et chronique d'éthanol. Il a été reporté par Qin *et al* (2008 et 2012) qu'une administration i.g. journalière de 5g/kg d'éthanol durant

10 jours chez des souris induit l'augmentation de TNF dans le foie, le sérum et le cerveau, de la NADHP oxydase dans le cerveau et de l'activation microgliale ainsi qu'une libération de ROS.^{191,193} Ces observations sont concomitantes à une élévation du marquage des neurones apoptotiques.¹⁹³ Cela démontre le rôle de la neuroimmunité dans la neurodégénérescence due à la consommation abusive d'éthanol. Ces observations suggèrent également l'existence d'un axe foie-cerveau puisque la production de cytokines dans le foie induit une hausse de cytokines au sein du sérum et du cerveau. Ce point est étudié dans le paragraphe II.4.

ii. Traitement ciblant la microglie et les facteurs associés dans un contexte d'alcoolisation

Des études expérimentales d'alcoolisation chronique utilisant l'antibiotique la minocycline, inhibiteur de l'activation microgliale, montrent des résultats probants. De manière intéressante, les souris quotidiennement alcoolisées et, traitées à la minocycline réduisent leur prise journalière d'éthanol.²⁰⁰ Qi et Crews (2012) ont indiqué une réduction effective de l'activation microgliale chez des souris traitées à des doses élevées d'éthanol durant 10 jours puis à la minocycline 24 heures avant la fin de l'alcoolisation.²⁰¹ Ces observations sont associées à une diminution de la production de ROS et à la mort neuronale. Le blocage des TLR permet également une protection des neurones contre les effets délétères de l'éthanol sur l'activation microgliale chez des souris déficientes en TLR-2 ou TLR-4 comparées aux souris wild type.¹⁹⁷ La modulation pharmacologique des voies neuro-immunes pour le traitement des effets néfastes de la consommation excessive et chronique d'éthanol sur le cerveau constitue une piste thérapeutique intéressante.^{202,203}

iii. Association entre l'activation microgliale et les perturbations de la neurotransmission

Les recherches se sont concentrées récemment sur le rôle des récepteurs TLR-4 de la réponse immune innée dans la neurotransmission défaillante lors d'une intoxication chronique éthylique.²⁰⁴

De nombreuses études ont montré l'action aiguë de l'éthanol sur les systèmes de neurotransmission, tels que les neuro-signalisations GABAergique, glutamatergique, dopaminergique, sérotoninergique, opioïdique et endocannabinoïdique dans le cerveau adulte. Par exemple, les récepteurs glutamatergiques de l'acide N-méthyl-D-aspartique (NMDA-R) dans un contexte d'intoxication aiguë sont inhibés, ce qui revient à une inhibition de la neurotransmission excitatrice. La neurotransmission GABAergique et les

récepteurs GABA-A sont des cibles directes des molécules d'éthanol. Ces dernières potentialisent ce type de récepteurs et induisent la neurotransmission inhibitrice de l'activité synaptique via l'entrée des ions Cl⁻. Cela entraîne des troubles comportementaux typiques, du type sédatif, lesquels augmentent avec les doses ingérées d'éthanol. La consommation chronique d'éthanol induit des changements neuro-adaptatifs dans les systèmes de neurotransmission.¹⁸⁷ Cela initie des changements dans le système de récompense dont un renforcement positif des effets de l'éthanol. La consommation chronique d'éthanol engendre une surexpression des NMDA-R et ainsi une sensibilité amplifiée à l'excitotoxicité.¹⁹² L'excitotoxicité glutamatergique a un rôle majeur dans la neurodégénérescence due la consommation chronique d'éthanol. Ce phénomène d'hyperexcitabilité a été lié à l'augmentation de la réponse neuroimmune. En effet, les mécanismes en cause sont notamment amputés à la libération de médiateurs pro-inflammatoires, décrite lors d'une consommation chronique d'éthanol. Le HMGB-1 et IL-1 β , libérés par les cellules lésées et les cellules gliales, conduisent à une stimulation des TLR-4 des neurones, ce qui active le transfert des NMDA-R, par l'activité kinase, à la surface dendritique et une hyperexcitabilité glutamatergique.²⁰⁵ Ces observations mettent en évidence le rôle possible de la microglie dans les changements de neuro-transmission suite à une consommation excessive et chronique d'éthanol.

4. Axe foie-cerveau

Le foie d'un consommateur excessif d'alcool est une source de production massive de marqueurs inflammatoires. Par exemple, il est souvent relevé que le taux de CRP, marqueur classique d'une inflammation systémique, est élevé dans le sérum d'hommes ayant une consommation élevée d'alcool hebdomadaire.^{206,207} Les consommateurs chroniques ont également des taux élevés de cytokines pro-inflammatoires telles que IL-1, IL-6, TNF, dans le plasma, le foie et le cerveau.²⁰⁸⁻²¹⁰ Des augmentations du taux de MCP-1 et d'Iba-1, marqueur de l'activation microgliale, ont été trouvées dans les cerveaux de consommateurs de plus de 280 g d'éthanol par semaine.¹⁹⁸ Les cytokines libérées par les cellules immunitaires activées et des hépatocytes lésés, parcourent la circulation sanguine et atteignent les organes très vascularisés tels que le cerveau. Une étude a révélé la capacité du TNF périphérique radio-marqué à passer la BHE à l'aide des récepteurs endothéliaux (p55 et p75).²¹¹ Les cytokines sont en effet capables de passer la BHE, et peuvent ainsi activer la réaction inflammatoire, qui comprend l'activation de la microglie, au sein du tissu cérébral. De plus, ces productions de médiateurs pro-inflammatoires sont corrélées aux différents stades de l'atteinte hépatique due à la consommation excessive d'éthanol. Il a été montré que des personnes consommatrices d'alcool ayant une cirrhose ou une insuffisance

hépatique avaient plus de lésions cérébrales que les personnes consommatrices sans un foie malade.²¹² Les lésions hépatiques induites par la prise chronique de hautes doses d'éthanol participeraient donc aux lésions cérébrales, ce qui mettrait en évidence un axe foie-cerveau (figure 7).^{212,213} De manière intéressante, le cerveau peut également avoir des effets sur l'inflammation hépatique. Campbell *et al* (2010) a démontré que l'injection intracérébrale d'IL-1 β , pour reproduire un modèle expérimental de sclérose en plaques, provoquait un recrutement des PNN dans le foie.²¹⁴ Ces données bibliographiques suggèrent que la consommation excessive et chronique d'éthanol induit un contexte d'inflammation systémique au sein du foie et du cerveau. Nous pouvons émettre des problématiques : quel est l'impact de cette comorbidité sur les dommages cérébraux suite à un traumatisme, tel que l'ischémie cérébrale ? L'ischémie cérébrale peut-elle moduler l'état du foie, qu'il soit sain ou malade suite à une consommation trop intense d'éthanol ?

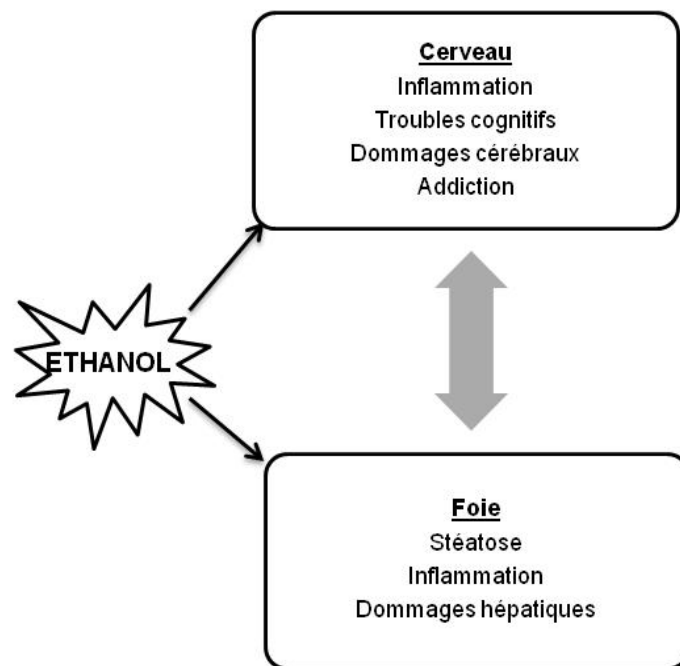


Figure 7 : Troubles physiopathologiques hépatiques et cérébraux dus à la consommation chronique d'éthanol (d'après²¹²).

III. Impact de la consommation chronique d'éthanol sur l'ischémie cérébrale

1. Consommation chronique d'éthanol : facteur de risque d'ischémie cérébrale

A. Facteur de survenue d'une ischémie cérébrale

Des études épidémiologiques suggèrent que la consommation excessive et chronique d'alcool est un facteur de risque d'accident vasculaire cérébral ischémique.²¹⁵⁻²¹⁸ Reynolds *et al* (2003) ont décrit une association non-linéaire en forme de courbe J entre la consommation d'alcool et le risque relatif d'avoir un infarctus cérébral dans une méta-analyse de 35 cohortes de patients. Une consommation quotidienne de moins de 24 g d'éthanol est associée à un risque relatif (RR) d'infarctus cérébral réduit (pour les consommateurs d'éthanol de moins de 12 g : RR=0,80 (intervalles de confiance (IC) 95% : 0,67-0,96) ; et pour les consommateurs entre 13 et 24 g : RR=0,72 (IC 95% : 0,57-0,91).²¹⁹ Le RR augmente chez les patients consommant plus de 60 g d'éthanol par jour.²¹⁹ Zhang *et al* (2014) ont également modélisé la corrélation non-linéaire entre la dose journalière d'éthanol consommée et le RR d'ischémie cérébrale à partir d'une méta-analyse de 27 cohortes de patients (figure 8).²²⁰ Les conclusions sont similaires : des faibles doses d'éthanol ingérées régulièrement sont associées à un risque plus faible d'infarctus cérébral alors que des doses élevées sont associées à un risque plus élevé.

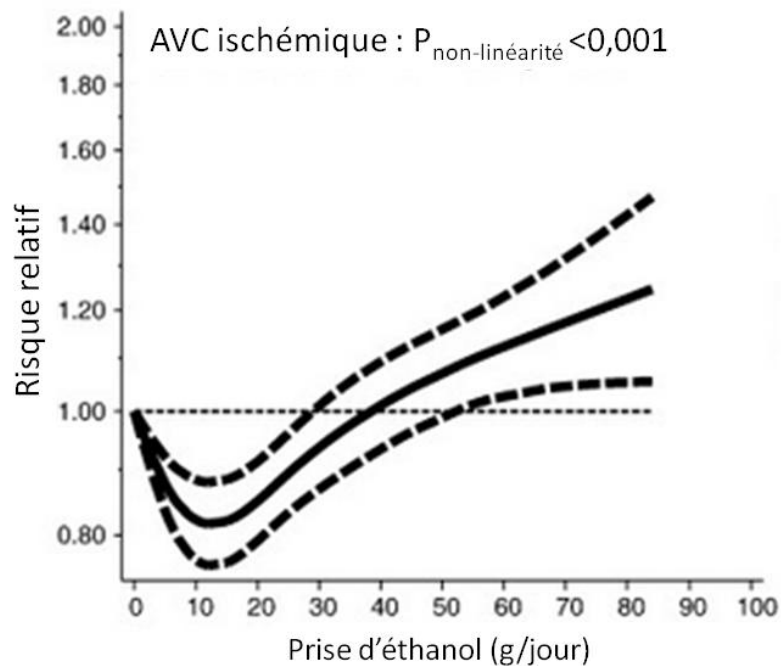


Figure 8 : Association entre le risque relatif d'ischémie cérébrale et la dose ingérée d'éthanol par jour (consommateurs versus non-consommateurs). Les courbes dose-réponse inférieure, intermédiaire et supérieure représentent respectivement le percentile de 10, 50 et 90% de la distribution (d'après ²²⁰).

B. Facteur de mortalité suite à une ischémie cérébrale

Les investigations cliniques ont montré une relation entre la consommation chronique d'alcool et le risque de décès suite à un infarctus cérébral.^{216,218,221} Cette association suit une courbe dose-réponse en forme de J. Les consommateurs abstinents ont un risque plus élevé de mourir d'une ischémie cérébrale.²²¹ Patra *et al* (2010) ont également montré une augmentation de la mortalité à des doses élevées d'alcool.²²² Cette méta-analyse a mis en évidence un effet selon le sexe sur la courbe d'association entre le RR de mortalité suite à un AVC et la dose d'éthanol consommée. Le RR de mortalité suite à une ischémie cérébrale chez les femmes ayant consommé quotidiennement près de 84 g d'éthanol (RR=2,31 ; IC 95% : 1,70-3,13 ; *versus* 0 verres de boissons alcoolisées), commençait à se distinguer des valeurs RR trouvées chez les hommes consommant la même quantité (RR=1,36 ; IC 95% : 1,23-1,50).²²³ Le RR de mortalité augmente considérablement en fonction de la dose chez les femmes, avec une valeur approximative de 5,5 pour une consommation s'élevant à 12 verres par jour (ou 10 selon la réglementation des Etats-Unis concernant la dose autorisée d'éthanol pur par verre; figure 9).²²²

Dans un modèle expérimental de gerbilles alcoolisées quotidiennement durant six semaines, le pourcentage de mortalité, suite à une opération consistant à une ligature

unilatérale de la carotide pour induire une occlusion artérielle permanente s'élève à 45% contre 24% chez les gerbilles non alcoolisées.²²⁴

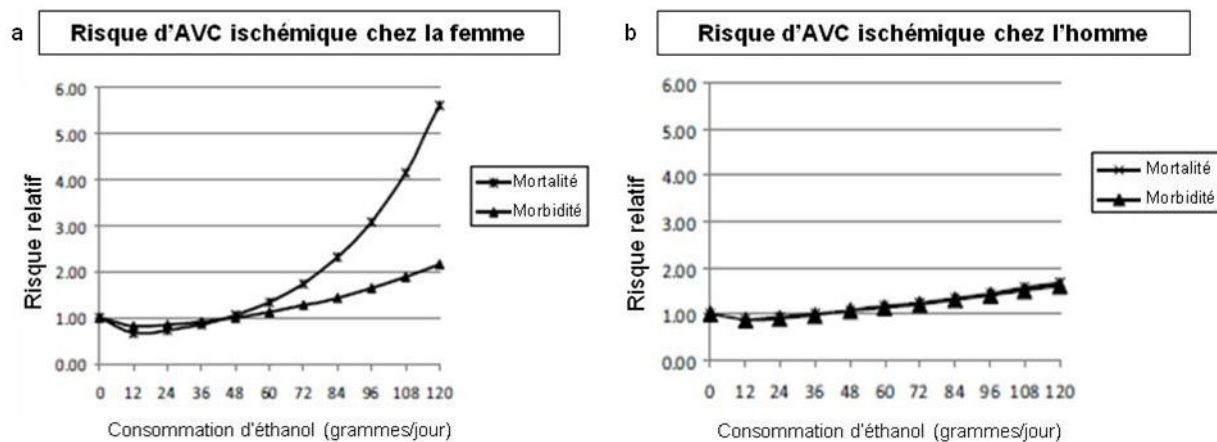


Figure 9: Méta-analyse montrant l'association en forme de J dose-dépendante de la consommation d'éthanol avec le risque relatif de mortalité et de morbidité suite à une ischémie cérébrale par sexe. a. chez la femme ; b. chez l'homme (d'après ²²³).

2. Facteur modulateur des déficits fonctionnels suite à l'ischémie cérébrale

Des index d'évaluation du handicap permettent de scorer les patients ayant eu une pathologie neurologique et un potentiel retentissement fonctionnel dans leur quotidien. L'échelle de Rankin modifiée permet de scorer de 0 à 5 un patient ayant eu un AVC, allant de « Aucun symptôme » (0) à « Handicap sévère » (5) (tableau 3). Il existe également l'index de Barthel, lequel évalue le patient de 0 à 100 points (0 à 20 correspondant à un état grabataire et 100 à une indépendance complète).²²⁵ Ce score comporte 10 items et permet une évaluation complète du handicap du patient.

Score	Degré d'handicap
0	Pas de symptômes
1	Pas d'incapacité Symptômes n'interférant pas avec les activités de la vie courante et l'autonomie
2	Handicap faible Restriction de certaines activités de la vie courante, autonomie conservée
3	Handicap modéré Nécessité d'une aide partielle, mais capable de marcher sans assistance
4	Handicap modérément sévère Marche et gestes quotidiens impossibles sans assistance
5	Handicap sévère Grabataire, incontinent et nécessitant des soins de <i>nursing</i> permanent

Tableau 3: Score de Rankin modifié.

L'effet de la consommation chronique d'alcool sur les résultats de l'infarctus cérébral chez l'homme a été rarement abordé. Une unique étude menée par Rist *et al* (2010) a précisément évalué l'effet de la consommation chronique d'alcool sur le résultat fonctionnel de l'ischémie cérébrale.²²⁶ Cette étude prospective de cohorte n'a pas montré d'association forte entre la consommation d'alcool et les déficits fonctionnels suite une ischémie cérébrale. Ils ont conclu qu'être consommateur d'un verre par semaine est associé à un RR moins élevé d'avoir un score de Rankin de 4-6, donc à un handicap sévère. Une consommation excessive n'est pas significativement associée au score d'évaluation fonctionnelle après un infarctus cérébral.²²⁶

D'un point de vue expérimental, l'évaluation fonctionnelle s'apparente à des tests comportementaux réalisés dans les modèles rongeurs d'AVC. Les analyses se concentrent sur les déficits moteurs et les déficits sensoriels. Les principaux tests comportementaux sont répertoriés dans le tableau 4. Les modèles expérimentaux d'ischémie cérébrale suivie d'une consommation excessive et chronique chez l'animal ont montré une augmentation significative de ces déficits fonctionnels par rapport aux animaux ischémiés non alcoolisés.^{227,228} L'intégration de la mesure des déficits fonctionnels dans les modèles d'AVC est complémentaire à l'évaluation de la taille de l'infarctus cérébral et n'est pas systématique dans les études pré-cliniques.

Tests comportementaux	Fonction
Score composé	Évaluation d'une variété de réponses motrices, sensorielles, réflexes et d'équilibre
Test du cylindre	Évaluation de l'utilisation spontanée des membres supérieurs
Marche sur grille	Évaluation de la fonction sensori-motrice, la coordination motrice
Test de l'escalier	Évaluation de l'extension des membres supérieurs et des compétences de préhension
Test de préhension	Évaluation de la fonction des membres antérieurs
Test <i>Corner</i>	Évaluation des asymétries sensori-motrices et posturales
Accélération rotarod	Évaluation de la coordination motrice et de l'équilibre
Retrait du ruban adhésif	Évaluation de la réponse et asymétrie sensorielle des pattes supérieures

Tableau 4 : Principaux tests comportementaux permettant l'évaluation des fonctions primaires dans les modèles animaux d'AVC (d'après ²²⁹).

3. Facteur de sévérité de l'ischémie cérébrale

Bien que l'étude de l'association de l'AVC et du facteur « consommation chronique d'éthanol » fasse l'objet de nombreuses études épidémiologiques, la prospection de l'impact de ce facteur sur la sévérité de l'ischémie cérébrale est inexistante dans la recherche clinique.

A. Impact de la consommation chronique d'éthanol sur la sévérité de l'ischémie cérébrale

Des expériences ont été cependant réalisées dans des modèles animaux. Dans les études expérimentales, la consommation répétée de doses élevées d'éthanol a été rapportée pour augmenter le volume de l'infarctus cérébral.^{224,228,227,230,231}

Sun *et al* (2008) ont montré une exacerbation des lésions induites par l'ischémie cérébrale focale transitoire chez les rats ayant eu une dose journalière d'un régime *liquid diet* d'éthanol 6,4% v/v durant huit semaines.²²⁸ Zhao *et al* (2011) ont fait la même observation en

utilisant le même modèle expérimental, et dans une deuxième publication, ont comparé ces résultats à ceux d'une consommation chronique d'une faible dose d'éthanol (1% v/v).^{227,230} Ils ont démontré que l'effet était inverse entre ces deux études, après huit semaines d'intoxication, avec une nette récupération tissulaire par rapport aux rats non alcoolisés.²³⁰ La neuroprotection conférée par un pré-traitement à des faibles doses d'éthanol lors d'une ischémie reperfusion a été vérifiée chez des souris C57BLACK/6J.²³²

L'intérêt d'utiliser des modèles pré-cliniques réside notamment dans le fait qu'ils permettent une analyse mécanistique approfondie, en particulier de l'impact de la consommation de l'éthanol sur les différentes phases caractérisant la cascade ischémique.

B. Mécanismes sous-jacents liés à l'impact de la consommation chronique d'éthanol sur l'ischémie cérébrale

L'ischémie cérébrale est caractérisée par une succession d'événements physiopathologiques (figure 2). Zhao *et al* ont mis en cause l'impact délétère de la consommation excessive et chronique d'éthanol sur la régulation positive de deux mécanismes associés à l'ischémie cérébrale suivants: l'excitotoxicité glutamatergique²³⁰ et du stress oxydant.²²⁷ En dépit du rôle majeur de l'inflammation dans le foie et dans le cerveau lors d'une alcoolisation régulière, cette voie n'a été pas explorée dans les interactions entre la consommation chronique d'éthanol et l'ischémie cérébrale.

i. Excitotoxicité glutamatergique

L'excitotoxicité du glutamate est une voie majeure de la cascade ischémique au sein du cerveau.¹⁸ Ce mécanisme est induit par l'augmentation du flux intracellulaire du calcium, consécutive à la déplétion énergétique suite à l'infarctus cérébral. L'activation des canaux voltage-dépendants facilite la libération du neurotransmetteur glutamate dans la fente synaptique, ce qui stimule intensivement les récepteurs au glutamate (NMDA-R, AMPA-R, kainate). Cette suractivation majore l'influx de calcium et de sodium, et s'accompagne d'une dépolarisation massive et d'un œdème cytotoxique dû au passage des molécules d'eau.¹⁹ Ce phénomène excitotoxique entraîne une production de ROS et l'activation de gènes pro-inflammatoires.

Zhao *et al* (2011) ont émis l'hypothèse que l'aggravation du profil lésionnel ischémique due à une intoxication chronique à l'éthanol antérieure à l'occlusion artérielle était liée à une augmentation de l'excitotoxicité glutamatergique.²³⁰ Ils ont observé une augmentation des taux protéiques de la sous-unité GluN1 du NMDA-R et une diminution des taux du

transporteur des acides aminés excitateurs 2 (EAAT-2), transporteur du glutamate, dans le cortex pariétal des rats alcoolisés à haute dose d'alcool et ischémiés. Compte tenu des régulations positives des NMDA-R et négatives des EAAT-2 par la consommation excessive et chronique d'alcool dans le cerveau, ces résultats sont cohérents et mettent en évidence le rôle majeur de l'excitotoxicité glutamatergique dans les lésions ischémiques et l'impact considérable de la consommation d'alcool sur ce mécanisme post-ischémique.

La même équipe a examiné l'effet du traitement par l'antagoniste du NMDA-R (mémantine) dans ce modèle expérimental, puisque ce traitement s'est avéré bénéfique dans de multiples modèles d'ischémie cérébrale.²³³⁻²³⁵ Le traitement a été protecteur uniquement dans le modèle d'alcoolisation chronique à haute dose.²³⁰ Les effets bénéfiques que procurent distinctement la consommation chronique d'une faible dose d'éthanol et un traitement aigu à la mémantine, sur les dommages cérébraux dus à un événement ischémique, ne sont pas synergiques.²³⁰

ii. Stress oxydant et nitrant

Les ROS sont des éléments fondamentaux de la mort neuronale précoce et tardive durant l'ischémie cérébrale. Leur augmentation est due à divers mécanismes, tels que le dysfonctionnement mitochondrial, l'inflammation et la perturbation de la BHE. L'enzyme NADPH oxydase est une source majeure de superoxydes. L'implication de cette enzyme dans l'ischémie cérébrale a été prouvée, c'est pourquoi Zhao *et al* (2010) ont exploré son rôle dans l'effet délétère de la consommation excessive et chronique d'éthanol sur le volume de l'infarctus cérébral observé dans leur modèle animal.²²⁷ Ils ont montré une élévation du taux de superoxydes et de gp91phox, sous-unité de la NADPH oxydase, dans le cortex pariétal des rats ayant eu un régime *liquid-diet* éthanol 6% durant huit semaines suivi d'une OACM transitoire. Ces données suggèrent qu'une intoxication chronique à des doses élevées d'éthanol module le stress oxydant post-ischémique. Un traitement aigu ou chronique à l'apocynine, agent inhibiteur de la NADPH oxydase, réduit significativement les lésions cérébrales des rats alcoolisés et les taux de gp91phox et de superoxydes.²²⁷

Les voies impliquées dans l'effet délétère de l'éthanol dans les dommages tissulaires causés par une ischémie cérébrale doivent être explorées davantage.

Présentation du travail

Suite à une série d'échecs thérapeutiques pour réduire les dommages cérébraux consécutifs à une ischémie cérébrale chez l'homme, les neuroscientifiques modélisent des nouveaux paradigmes expérimentaux intégrant des facteurs de comorbidités afin de se rapprocher de la réalité clinique. La consommation d'éthanol est ancrée dans notre société et concerne une grande partie de la population mondiale, bien qu'elle soit associée à de nombreuses conséquences organiques et au développement de diverses maladies. Si ce facteur influence le risque de survenue d'infarctus cérébral chez l'homme, son impact sur les déficits neurologiques et fonctionnels, et la physiopathologie de l'ischémie cérébrale a été très peu décrite et, principalement étudiée dans les modèles pré-cliniques.

Afin de pallier le manque de transversalité entre les modèles précliniques et les études cliniques, nous avons pour objectif premier de faire une étude de recherche translationnelle, intégrant une partie expérimentale chez l'animal et une partie clinique. Nous avons mis en place un modèle d'alcoolisation chronique (avec une dose moyenne ou une dose forte d'éthanol) suivie d'une ischémie cérébrale transitoire chez le rat afin d'étudier l'évolution des lésions cérébrales, les déficits fonctionnels, la neuroinflammation post-ischémique et l'inflammation hépatique, un jour (J1) et une semaine (J7) après l'occlusion artérielle. Nous avons étudié les caractéristiques cliniques et les données biologiques d'une cohorte de 435 patients ayant eu une ischémie cérébrale : l'étude *Biostroke* (ClinicalTrials.gov, Identifier : NCT00763). Nous avons également eu pour but d'analyser le lien entre le cerveau et le foie dans un contexte d'alcoolisation chronique et d'ischémie cérébrale.

Nous avons, à l'aide de cette méthodologie, trois principaux résultats. Premièrement, nous avons montré chez l'animal comme chez l'homme que l'alcoolisation chronique et à haute dose aggrave le pronostic lésionnel et fonctionnel des AVC. Deuxièmement, nous avons mis en lumière le rôle potentiel des processus inflammatoires dans cet effet délétère dans le modèle animal. Nous avons montré que le PNN joue un rôle central, notamment par ses interactions avec la paroi vasculaire et le parenchyme cérébral chez l'animal. Troisièmement, nos résultats suggèrent que les effets délétères cérébraux s'intègrent dans un contexte inflammatoire systémique puisque le foie est touché par des processus similaires à ceux observés dans le parenchyme cérébral.

Nos résultats permettent de discuter de l'impact de la consommation excessive et chronique d'éthanol sur (i) les déficits neurologiques et fonctionnels dans la phase aigüe et sub-aigüe de l'ischémie cérébrale chez l'homme et dans le modèle animal, (ii) la neuroinflammation induite par l'activation microgliale, l'infiltration des PNN et l'expression des protéines d'adhésion, (iii) les relations entre les effets centraux et périphériques, notamment hépatiques, de l'alcoolisation chronique.

Méthodes

I. Etude expérimentale animale : matériel et méthodes

1. Animaux

Les rats étudiés sont de souche Wistar. Il s'agit de mâles, sevrés et âgés de quatre semaines (élevage Janvier). Ils disposaient d'un libre accès libre à l'eau et à la nourriture (régime standard), et séjournaient dans un environnement contrôlé à 20°C avec une alternance jour/nuit de 12 heures. Les groupes de rats sont randomisés à leur arrivée par cage de trois à sept animaux. Le poids de l'animal est relevé à l'arrivée, et suivi chaque semaine jusqu'au jour de l'induction de l'ischémie cérébrale (jour de gavage 1 = G1, G7, G14, G21 et G28). Les expériences sont en accord avec la Directive du Conseil de la Communauté Européenne du 24 novembre 1986 (86/609/EEC) et les réglementations françaises (D2001-486) sur la protection des animaux utilisés en expérimentation. Les protocoles ont été approuvés par le Comité d'éthique en expérimentation animale n°75 (Réf : 00454.02).

2. Modèle d'alcoolisation chronique

Après cinq à huit jours d'acclimatation dans l'animalerie conventionnelle, les rats sont alcoolisés durant quatre semaines jusqu'à la veille de l'ischémie cérébrale. Il s'agit d'un gavage intra-gastrique (i.g.) de 5 ml/kg effectué deux fois par jour avec une solution d'éthanol préparée à 35% (A35) ou 10% v/v (A10) ou avec de l'eau (VEH), ce qui permet d'avoir des rats véhicules dans le but de s'affranchir du facteur mécanique du passage de la sonde dans l'analyse (figure 10). Des échantillons de sang sont réalisés par prélèvements au niveau du sinus rétro-orbital afin de mesurer l'alcoolémie entre deux gavages journaliers, chaque semaine durant la période d'alcoolisation (G7, G14, G21 et G28).



Figure 10: Illustration du gavage par sonde intra-gastrique.

3. Modèle d'occlusion intraluminale de l'artère cérébrale moyenne

Le lendemain du dernier jour de gavage, les rats ont atteint un poids variant de 280 g à 330 g, ce qui est nécessaire pour la réalisation de l'occlusion artérielle.²³⁶ Nous avons arrêté le protocole d'alcoolisation la veille de l'opération afin d'éviter les interactions entre l'éthanol et l'anesthésie. Le rat est anesthésié avec de l'hydrate de chloral (300mg/kg, ALDRICH®) en i.p. Il est placé sous un microscope chirurgical (Leica M651) et incisé au niveau cervical, afin de dégager les glandes salivaires et les muscles. La bifurcation carotidienne droite et la bifurcation entre l'artère carotide interne et l'artère ptérygo-palatine sont mises en évidence, permettant la ligature de l'artère ptérygo-palatine. La carotide externe est ligaturée à son origine ainsi que la carotide commune, le plus en amont possible. Un nœud desserré est posé entre la ligature de la carotide commune et la bifurcation carotidienne. Un micro-clamp est fixé en-dessous du nœud, permettant de stopper le flux sanguin et de pratiquer une artériotomie sur l'artère carotide commune à l'aide d'un micro-ciseau. Après avoir enfilé un fil de nylon chirurgical 4.0 (Ethicon) de longueur calibrée à 28 mm et dont l'extrémité a été arrondie à la flamme, le nœud est serré et le clamp est retiré afin de monter le fil jusqu'à l'ostium de l'ACM (figure 11). L'incision est refermée laissant l'extrémité du monofilament sortie de la plaie. Au bout d'une heure d'occlusion, la reperfusion sanguine provenant du polygone de Willis est permise grâce au retrait du fil occlusif par son extrémité. D'autres animaux sont soumis aux mêmes conditions d'anesthésie et d'opération, à l'exception de l'occlusion artérielle. Le fil n'est pas monté jusqu'à la ACM chez ces animaux non-ischémiés (NI) dits sham. Suite à l'opération, nous avons étudié les rats à un jour (J1) ou à sept jours (J7) de reperfusion. Au total, nous travaillons donc sur 12 groupes de rats ayant subi un protocole distinct de gavages répétés et d'IR (figure 12).

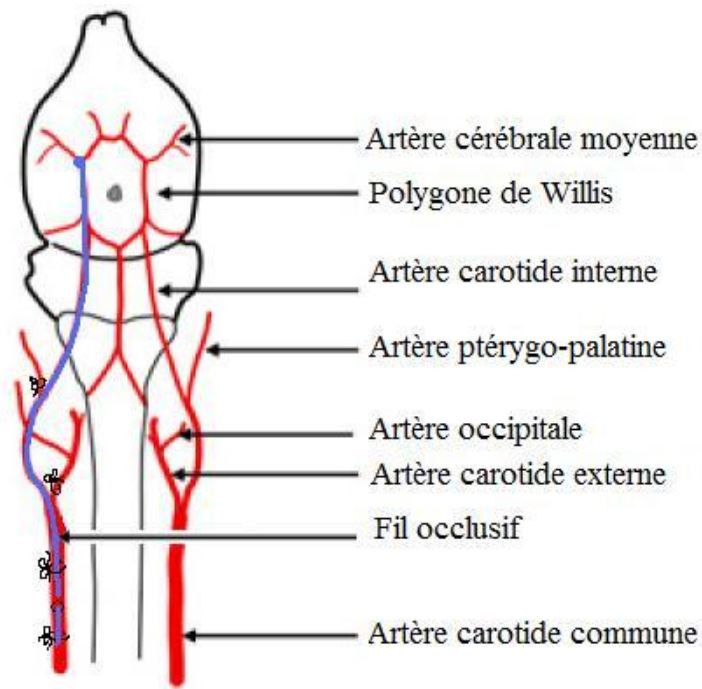


Figure 11 : Représentation schématique de l'occlusion de l'artère cérébrale moyenne droite par l'introduction d'un filament obstructif depuis l'artère carotide commune.

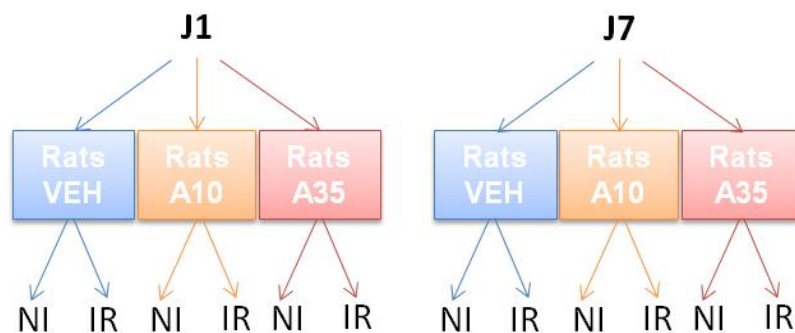


Figure 12 : Répartition des groupes de rats pour l'étude. A10 : gavage à l'éthanol 10% v/v ; A35 : gavage à l'éthanol 35 % v/v ; IR : ischémie/reperfusion ; J1 : 1 jour de reperfusion ; J7 : 7 jours de reperfusion. NI : non ischémié/sham ; VEH : véhicule.

4. Tests comportementaux

Les tests comportementaux ont été réalisés avant la mise à mort des animaux à J1 et à J7. Les animaux ont été acclimatés aux conditions de la plateforme de comportement deux semaines avant l'opération, soit une semaine avant le démarrage des tests comportementaux nécessitant un apprentissage. Le jour des tests, les rats ont été placés dans la salle une heure avant l'analyse pour réduire le stress de transfert entre la salle de

stabulation et la salle d'analyse. Les animaux étaient stabulés dans des armoires ventilées dans les mêmes conditions que celles appliquées au sein l'animalerie conventionnelle d'origine. Un ordre chronologique des tests a été rigoureusement respecté pour chaque animal et étudié de façon à avoir des conditions optimales de réponse. Cet ordre est énoncé ci-dessous.

A. Neuroscore de Bederson

Il s'agit d'un test évaluant les déficits neurologiques chez l'animal, établi par Bederson *et al* (1986).²³⁷ Le manipulateur soulève le rat par la base de la queue et observe les caractéristiques comportementales de déficits neurologiques (figure 13). Le tableau 5 permet d'établir un score de sévérité des déficits neurologiques.²³⁷



Figure 13 : Illustration du test de Bederson.

Sévérité des déficits neurologiques	Score (point)	Observations comportementales
Normale	0	Pas de déficit observable
Modérée	1	Flexion du membre antérieur
Sévère	2	Flexion du membre antérieur, diminution de la résistance à la pression latérale avec marche normale
	3	+ marche en trajectoire circulaire

Tableau 5 : Neuroscore de Bederson (d'après ²³⁷).

B. Test de l'actimétrie

L'actimètre (Panlab) permet de mesurer l'activité spontanée motrice du rat durant un temps déterminé.²³⁸

Le dispositif est composé d'une arène en plexiglas (45Lx45lx35H cm), et posé sur un sol noir avec une lumière de 270 lux. Deux cadres d'une épaisseur de 3cm, composés de rangées de capteurs infrarouges, encadrent l'arène et, permettent d'enregistrer la dimension horizontale (à 1 cm de hauteur, activité motrice) et la dimension verticale (à 12 cm de hauteur, redressement du rat). Le système infrarouge est relié à un boîtier convertisseur LE 8811 Motor Activity monitor V, directement connecté à un PC (figure 14).

Le traitement des données est réalisé avec le logiciel Actitrack DT version 2.75 (Panlab) qui permet de faire l'analyse en temps réel mais aussi l'analyse post-traitement telle que la distance totale parcourue. La durée du test est de 10 minutes.²³⁸

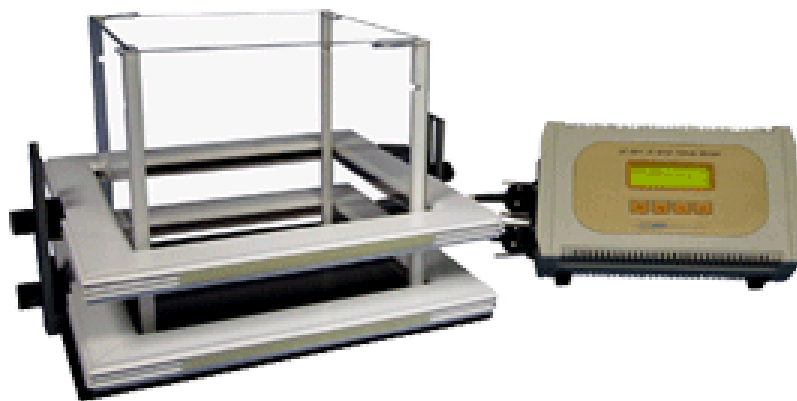


Figure 14 : Dispositif pour le test de l'actimétrie.

C. Test de retrait du ruban adhésif

Ce test permet d'approcher les capacités sensori-motrices de l'animal.²³⁹ Le rat est placé dans une enceinte en plexiglas transparente avec des rubans adhésifs (3M) couvrant les paumes des deux pattes supérieures (figure 15). Une session d'apprentissage est nécessaire avant l'opération. Nous considérons un apprentissage satisfaisant quand le rat retire trois fois de suite les deux rubans adhésifs en moins de 10 secondes le dernier jour de l'apprentissage. Si le rat ne parvient pas à apprendre le test, il est exclu de l'analyse comportementale.

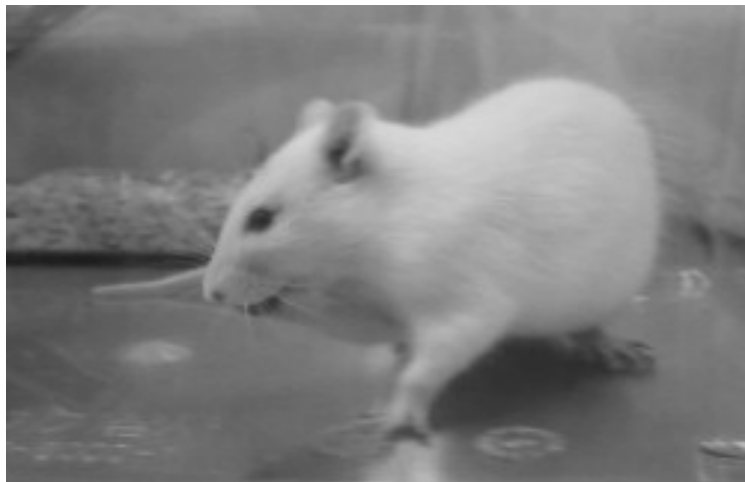


Figure 15 : Illustration du test de retrait du ruban adhésif.

Le jour du test, les temps de retrait et d'essai de retrait (lorsque le rat secoue les pattes ou les porte à la bouche) de deux rubans adhésifs sont chronométrés. Le test prend fin au bout de 120 secondes si le score maximal n'est pas atteint. Le test est renouvelé trois fois. Les performances du rat sont scorées en fonction d'une échelle de points dans le temps imparti pour le test (tableau 6).

Score	Comportement de l'animal
0	Aucun essai de retrait des rubans adhésifs
1	Essai de retrait du ruban adhésif de la paume ipsilatérale exclusivement
2	Essai de retrait des deux rubans
3	Retrait du ruban adhésif de la paume ipsilatérale, pas d'essai de retrait du ruban de la paume controlatérale
4	Retrait du ruban adhésif de la paume ipsilatérale, et essai de retrait du ruban de la paume controlatérale
5	Retrait des deux rubans

Tableau 6 : Score d'évaluation du test de retrait du ruban adhésif.

D. Test de préhension

Ce test permet d'évaluer la force musculaire et la dextérité des pattes supérieures de l'animal.²⁴⁰

Le dispositif est composé de deux barres verticales de 60 cm de hauteur, à 40 cm de distance l'une de l'autre et reliées par un fil d'acier horizontal permettant d'agripper les deux pattes avant de l'animal (figure 17). Une fois que l'animal est positionné au centre de la barre horizontale, le temps de suspension est mesuré jusqu'à ce qu'il se laisse tomber ou s'échappe sur l'une des deux extrémités du dispositif (score maximal). Trois essais sont chronométrés. Un score a été établi au laboratoire en fonction du temps de suspension dans le tableau 7.

Un point supplémentaire est accordé au score final lorsque le rat accroche au moins l'une de ses pattes inférieures durant le test de suspension. Lorsque le rat s'échappe sur l'une des extrémités du test, quatre points sont accordés à l'animal (score maximal).



Figure 17 : Illustration du test de préhension.

Score	Temps de suspension sur la barre - Comportement
1	0 à 5 secondes
2	6 à 10 secondes (ou score 1 + 1 point bonus)
3	11 secondes et plus (ou score 2 + 1 point bonus)
4	Le rat s'échappe (ou score 3 + 1 point bonus)

Tableau 7 : Score pour l'évaluation de la force musculaire des pattes supérieures. Le point bonus est attribué lorsque le rat agrippe une ou ces deux pattes inférieures au moins une fois durant de la suspension sur la barre.

E. Test du rotarod

Ce test permet d'évaluer la coordination motrice du rat par la mesure du temps de chute sur une rampe d'accélération.²⁴⁰

Une fois l'animal placé sur le tambour à voies multiples du rotarod, le temporisateur démarre (figure 18). Lorsque l'animal tombe, en toute sécurité dans son propre couloir, le temps de chute (en minutes et secondes) et la vitesse de rotation sont automatiquement enregistrés. Une cloison amovible supérieure est incluse afin d'éviter les interférences entre les animaux qui courent dans des voies adjacentes. La rotation est réglée, électroniquement, pour une accélération de la vitesse, de 4 à 40 rotations par minute (rpm) sur deux minutes.

Une période d'apprentissage est nécessaire (environ une semaine avant l'opération). L'apprentissage (A) est réussi quand le rat a fait trois essais successifs de plus de 20 rpm sans tomber du cylindre en marche. L'animal ne parvenant pas à apprendre le test est exclu de l'analyse. Le jour du test (T), le rat est soumis à trois essais sur la rampe de vitesse. L'analyse de la perte motrice (P) est faite avec la mesure du temps de course (C) et est exprimée en pourcentage à l'aide de l'équation suivante :

$$P = 100 - (100 \times (\text{moyenne des 3 essais réussi } C_A) / (\text{moyenne des 3 essais } C_T))$$

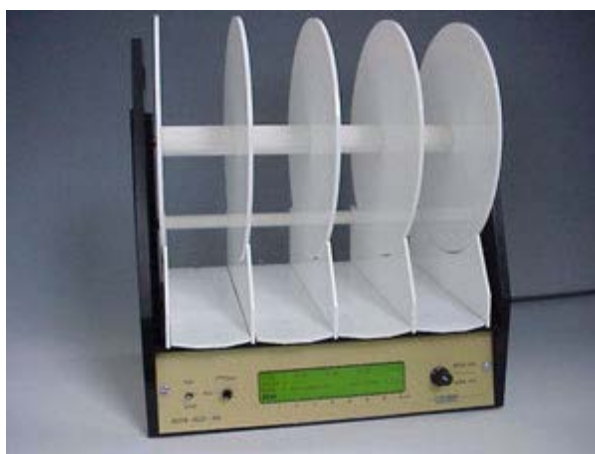


Figure 18 : Dispositif du test du rotarod.

5. Mise à mort et préparation des tissus

Après un ou sept jours de reperfusion et à la suite de l'analyse comportementale, le rat est endormi au doléthal (50mg/kg en i.p.) avant les trois types de mises à mort induites pour le prélèvement des tissus destinés aux études histomorphométrique, biomoléculaire et histologique décrites ci-dessous. La cinétique de l'étude est schématisée dans la figure 19.

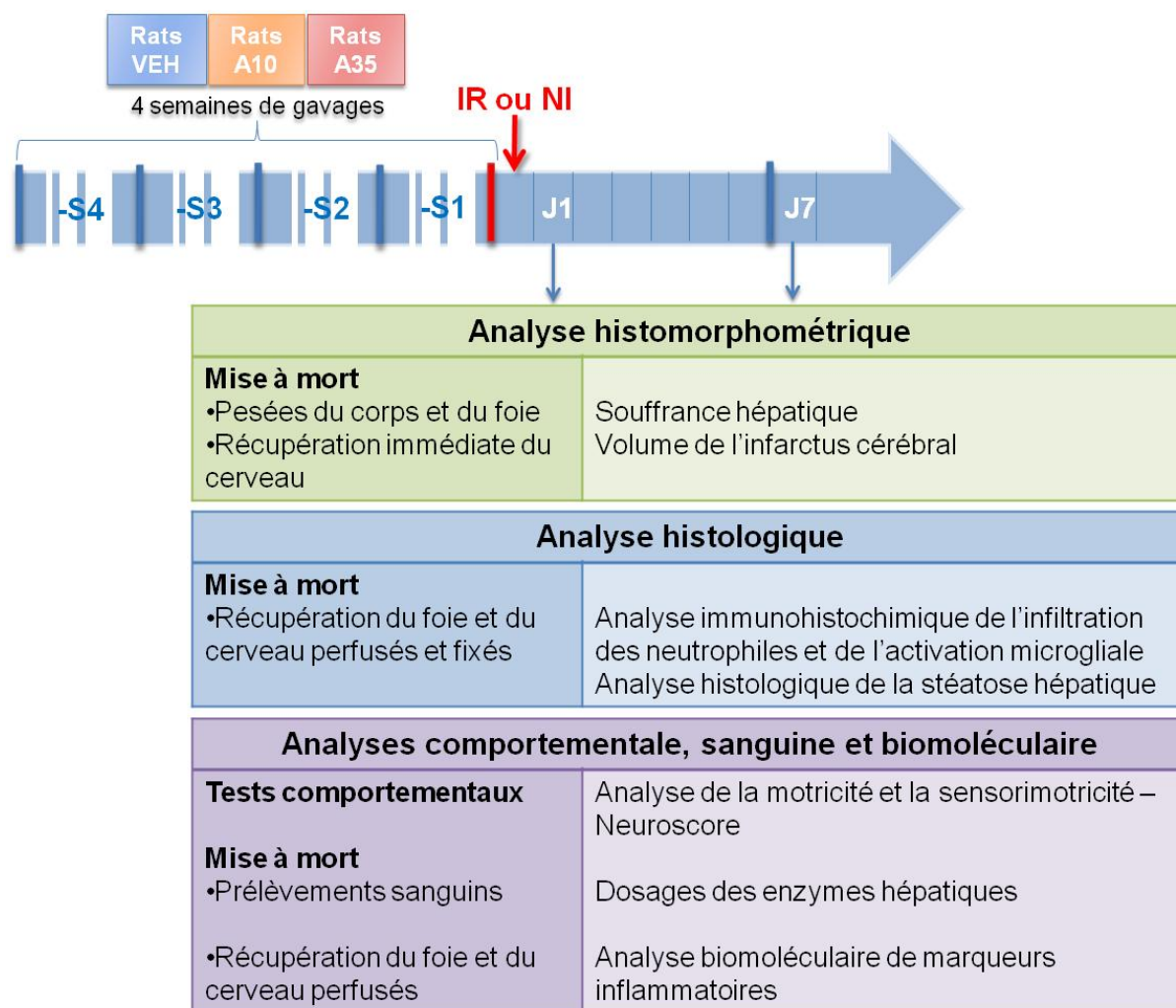


Figure 19 : Schéma du protocole d'étude du modèle animal d'alcoolisation chronique suivie d'une ischémie cérébrale/reperfusion. A10: gavage à l'éthanol 10%v/v ; A35: gavage à l'éthanol 35%v/v ; IR: ischémie/reperfusion ; J: Jour ; NI: non ischémié/Sham ; S: semaine ; VEH : véhicule

A. Etude histomorphométrique

Le prélèvement du cerveau est réalisé rapidement après la décapitation et l'ouverture de la boîte crânienne. Il est refroidi dans l'isopentane et réservé à -20°C. Des coupes frontales de 50 µm sont réalisées au cryostat à -25°C, selon 12 stades décrits dans l'atlas de stéréotaxie de Paxinos et Watson (1986, figure 20).²⁴¹ Les tranches sont déposées au nombre de quatre par lame gélatinée.

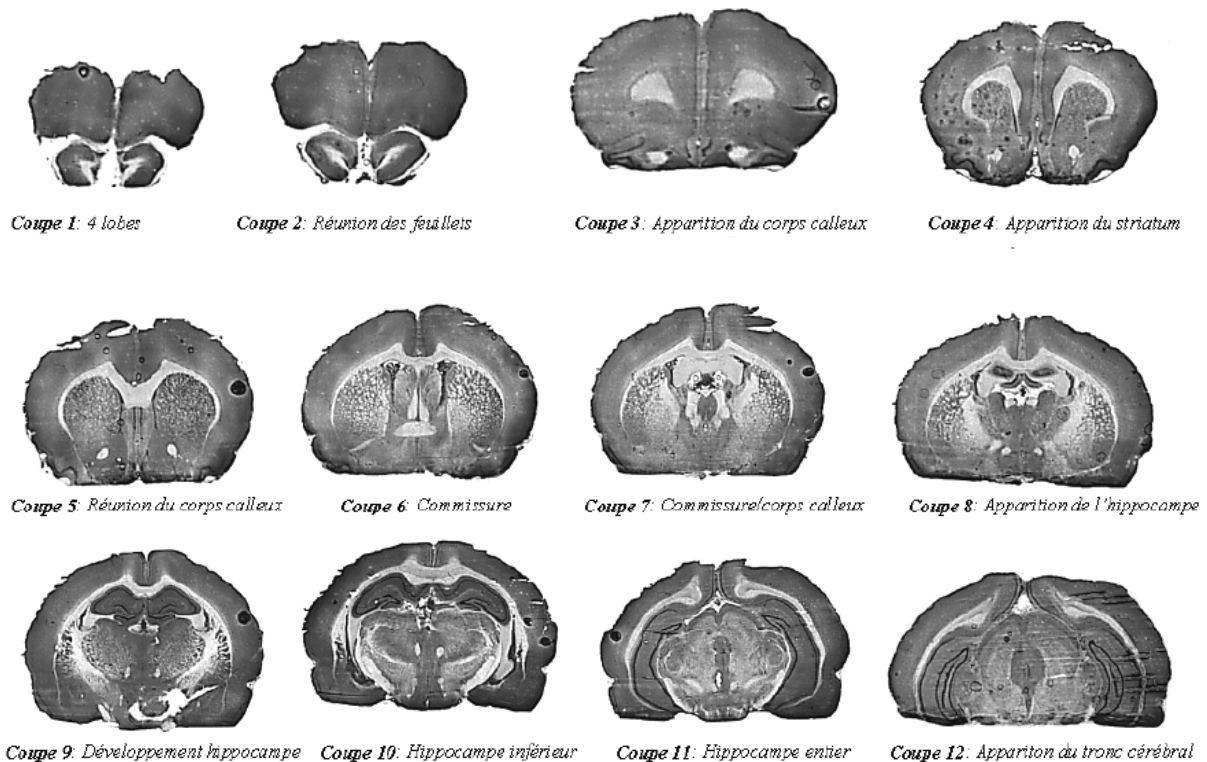


Figure 20 : Représentation des 12 coupes de cerveaux nécessaires pour l'évaluation volumétrique de l'infarctus cérébral.

B. Etudes sanguines et biomoléculaires

Après la réalisation d'une thoracotomie permettant l'accès au cœur, un prélèvement sanguin est effectué dans le ventricule gauche. La collection de 50 µl de sang dans un tube EDTA permet la numération de formule sanguine dans l'heure de prélèvement. Un deuxième prélèvement d'environ 1,5 mL de sang dans un autre tube EDTA est centrifugé à 1500 g durant 15 minutes à 4°C. Le surnageant (plasma) est ensuite placé à -20°C en attendant son utilisation.

Une fois le ventricule gauche cathétérisé et l'oreillette droite incisée, la perfusion intracardiaque du rat au sérum physiologique hépariné froid peut commencer. Lorsque celle-ci est satisfaisante, un morceau du foie est immédiatement découpé et placé dans de l'azote liquide de manière à refroidir rapidement le tissu et le conserver à -80°C. Le rat est décapité afin de récupérer le cerveau de la boîte crânienne. Le cerveau dépourvu du cervelet est disséqué de façon à extraire le cortex, l'hippocampe et le striatum des hémisphères gauche et droit. Les échantillons sont ensuite plongés dans l'azote liquide puis placés à -80°C jusqu'à leur utilisation.

C. Etude histologique

Le rat est soumis à une perfusion intracardiaque de sérum physiologique puis de solution de paraformaldéhyde à 4% (PFA, Diapath), jusqu'à ce que les tissus soient entièrement fixés. Après une heure de post-fixation, le cerveau extrait de la boîte crânienne et le foie sont immergés dans une solution de PFA durant une nuit à 4°C. Les tissus sont ensuite transférés dans une solution cryoprotectrice de sucrose (Sigma®) à 20% puis à 30% à 4°C (24 heures pour chaque étape). Les tissus sont ensuite inclus dans un gel OCT, avant d'être congelés dans de l'isopentane (Sigma-Aldrich®) et conservés à -20°C. Quatre coupes de cerveaux de 20 µm (niveaux 5 à 8 selon la figure 20) et de foies de 10 µm ont été réalisées au cryostat à -25°C, et déposées sur des lames Superfrost® plus (Thermo-Fisher).

6. Analyse histomorphométrique

A. Coloration au crésyl violet

Après une fixation dans une solution FAM (10% formaldéhyde, 10% d'acide acétique, et 80% de méthanol, cinq minutes), les coupes sont lavées à l'eau courante durant 10 minutes et à l'eau distillée durant cinq minutes. La coloration est réalisée par une incubation de cinq minutes dans une solution de crésyl violet filtré à 50 mg/mL (20% éthanol absolu, 80% eau distillée, 500 mg d'acétate de crésyl violet pour 100ml). La déshydratation des coupes est effectuée par des bains successifs d'éthanol à concentration croissante (70°, 95°, et 100°) d'une durée de 30 secondes chacun. Après une fixation de la coloration dans deux bains de cinq minutes de Neo-Clear® (Merck), les lamelles sont montées avec du milieu de montage acrytol.

B. Quantification du volume de l'infarctus cérébral

Les zones cérébrales à faible densité cellulaire sont nettement discriminables à l'œil nu par l'appréciation d'une coloration faiblement marquée. A partir des coupes numérisées, les quantifications des volumes des zones infarctées totales, corticales et sous-corticales sont réalisées par la sélection des zones non colorées à l'aide du logiciel Image J (NIH). Les volumes sont calculés par l'intégration des aires mesurées des 12 niveaux de coupes (figure 20).

Les volumes de l'infarctus total (VIT), cortical (VIC) et sous-cortical (VIS), majorés par l'œdème cérébral, peuvent être corrigés selon la formule suivante²⁴²:

$$VIT_{\text{corrigé}} = VIT \times (\text{volume de l'hémisphère droit} / \text{volume de l'hémisphère gauche})$$

Le volume de l'œdème (VO) est approché par la différence entre le volume de l'hémisphère lésé et celui de l'hémisphère sain.

7. Analyses sanguines et biomoléculaires

A. Collection des échantillons plasmatiques

Les dosages de TGP et de TGO sont effectués automatiquement par l'équipement du Centre de Biologie Pathologie de Lille sur les plasmas des 12 groupes d'étude dédiés à l'analyse biomoléculaire. Des dosages sont également réalisés sur des rats qui ne sont soumis qu'au protocole de gavages (NO, non opérés).

L'alcoolémie est mesurée à l'aide du Kit ethanol colorimetric/fluorometric assay (Biovision®) à G7, G14, G21 et G28.

B. Extraction de l'ARN

Chaque tissu est homogénéisé dans une solution d'Extract-all® (Eurobio), composée de phénol et d'isothiocyanate de guanidine, à l'ULTRA-TURRAX® (IKA® T10 Basic). Après cinq minutes de repos pour permettre la complète dissociation des complexes nucléoprotéiques et l'ajout de 0,2 ml de chloroforme (SIGMA®) pour 1 ml d'Extract-all®, les échantillons sont centrifugés à 12 000 g durant 15 minutes à 4°C. Se forment trois phases dont la phase aqueuse supérieure incolore, laquelle contient exclusivement les ARN. Afin que les ARN précipitent, la phase aqueuse est transférée dans un nouveau tube avec 0,5 ml d'isopropanol (SIGMA®) pour 1 ml d'Extract-all® initial. Le mélange est laissé à température ambiante durant 10 minutes puis, est centrifugé à 12 000 g pendant 30 minutes à 4°C. Une fois le surnageant éliminé, le culot est vortexé et centrifugé à 7 500 g pendant cinq minutes à 4°C, avec 1 ml d'éthanol (FLUKA® Analytical) à 75% pour 1 ml d'Extract-all® utilisé au départ. Le culot d'ARN est séché à l'air libre et dissous dans de l'eau ultra-pure (Eurobio). La concentration de la préparation finale d'ARN totaux est dosée par le Nanodrop® (labtech.com) sur la plateforme d'interactions moléculaires et d'imagerie cellulaire de l'IMPRT. La solution est libre de contaminants si les ratios de la densité optique (A) 260 nm/A280nm et A230 nm /A260nm sont supérieurs à 1,8.

C. Synthèse des ADN complémentaires (ADNc)

Les possibles traces d'ADN sont dégradées grâce à une étape enzymatique assurée par la DNase. Le mélange réactionnel est composé de 5 µl de tampon 10X de l'enzyme (Roche), 1 µl de DNase I, et 2 µg d'ARN. Il est ajusté avec de l'eau qsp pour obtenir un volume final de 50 µl. Il est ensuite incubé à 37°C afin d'activer l'enzyme durant 40 minutes, et à 75 °C pour la désactiver pendant 25 minutes.

L'étape suivante consiste en la conversion de l'ARN en ADNc par l'activité de l'enzyme reverse transcriptase. Le mélange réactionnel est formé de 25 µl de solution d'ARNm, 8 µl de Tampon 5 X (5 X First Strand Buffer, Invitrogen™), 0,5 µL d'enzyme SuperScript® III Reverse Transcriptase (Invitrogen™), 2 µL d'hexamères (Random Primer, Invitrogen™) afin d'amorcer la réaction, 1 µL d'oligodT 0,1 M (Invitrogen™) et 1 µL de nucléotides (dNTP à 10 mM, Invitrogen™) pour l'élongation des brins afin d'obtenir un volume final de 37,5 µL. Les différentes étapes sont l'hybridation (10 minutes à 24°C), l'élongation de l'ADNc (40 minutes à 50°C) et la désactivation de l'enzyme (15 minutes à 75°C). Le volume du mélange est ensuite ajusté avec de l'eau qsp pour un volume final de 200 µL.

D. PCR quantitative en temps réel

La PCR quantitative en temps réel repose sur le suivi temporel du processus de PCR à l'aide de la détection de l'intensité de fluorescence. La quantification de l'ADNc répliqué en temps réel est permise par la mesure du nombre d'amplicons, sur lesquels se sont fixés des fluorophores SYBR green, spécifiques de l'ADN, à chaque cycle. Plus l'échantillon est concentré en molécules cibles, moins il faudra de cycles pour atteindre un point pour lequel le signal est significativement supérieur au seuil de détection de l'appareil. Ce point est défini comme le *Crossing point*.

Dans un premier temps, une amplification est produite sur un gène de référence, la protéine *TATA Binding Protein* (TBP), pour chaque échantillon. Le mélange réactionnel est composé de 1µl de la solution tube 1 (10µl du tube 1a, LightCycler® FastStart Enzyme dans le tube 1b LightCycler® FastStart Reaction Mix SYBR Green), 1,2µl d'eau qsp, 0,8µl de MgCl₂ 25 mM, 2µl de l'amorce sens de la TBP à 3 µM (TIB® MOLBIOL) 2 µl de l'amorce anti-sens de la TBP à 3 µM (TIB® MOLBIOL). Il est déposé dans des capillaires (LightCycler® capillaries, Roche) qui sont ensuite centrifugés. La PCR est permise automatiquement par le thermocycleur LightCycler® Instrument (Roche) selon les étapes suivantes : un cycle de huit minutes à 95°C suivi de 45 cycles répétés de 10 secondes de

dénaturation à 95°C, 10 secondes d'hybridation à 60°C et 10 secondes d'élongation à 72°C. Une courbe de fusion est établie permettant de vérifier la spécificité des amplicons.

Le niveau d'expression du gène codant pour ICAM-1 ou VCAM-1 est calculé dans chacun des échantillons d'ADNc issus des sessions J1 et J7. Les couples d'amorces utilisés (TIB® MOLBIOL) sont répertoriés dans le tableau 8.

Gènes d'intérêt	Séquences d'amorces
ICAM sens	5' - GCAGACCACTGTGCTTTGAG
ICAM anti-sens	5' - TCCAGCTCCACTCGCTCT
VCAM sens	5' - CAAATGGAGTCTGAACCCAAA
VCAM anti-sens	5' - GGTTCTTTCCGAGCAACG
TBP sens	5' - CCCACCAGCAGTTCAGTAGC
TBP anti-sens	5' - CAATTCTCGGGTTTGATCATTCTG

Tableau 8 : Liste des séquences d'amorces utilisées.

La variation d'expression génique de deux protéines d'adhésion est calculée en fonction du groupe NI VEH de la session correspondante (J1 ou J7), après avoir normalisé le niveau d'expression génique de la TBP. Les valeurs sont rapportées en pourcentage.

8. Analyse biochimique

A. Analyse histologique des lipides hépatiques

La stéatose hépatique est quantifiable grâce à la coloration à l'huile rouge des dépôts lipidiques.²⁴³ Les coupes de foies décongelées sont plongées une minute dans un bain d'alcool isopropylique 60% préparé extemporanément, puis une heure dans un bain de solution filtrée d'huile rouge (60% de solution mère composée de 0,5 g d'Oil Red O par dL d'alcool isopropylique à 98%, 40% d'eau distillée) et à nouveau dans un bain d'alcool isopropylique à 60% durant 30 secondes. Après un rinçage à l'eau osmosée, une contre-coloration à l'hématoxyline est réalisée durant cinq minutes, permettant le marquage bleuté des noyaux des cellules. Les lames sont ensuite montées à l'aide de glycérol (DAKO ®) avec une lamelle. L'observation des coupes est faite sous microscope au grossissement 630. La quantité de gouttelettes est calculée après binarisation de l'image et seuillage des niveaux de gris, à l'aide du logiciel image J (1.43, Wayne Rasband, NIH, USA).

B. Analyse immunohistochimique

Les premières étapes sont une fixation des coupes de foie et de cerveau dans une solution de Carnoy (10% d'acide acétique, 30% de chloroforme, et 60% de méthanol, 20 minutes), une perméabilisation cellulaire (PBS, 0,3% triton 10x, une heure), une inhibition des peroxydases endogènes (PBS, 0,3% H₂O₂, 30% méthanol, 30 minutes) et un blocage des sites d'interactions non spécifiques (PBS, 10% sérum bloquant chèvre, une heure). Les coupes sont ensuite incubées dans une solution de PBS à 5% de sérum bloquant de chèvre, avec les anticorps primaires polyclonaux de lapin anti-MPO (A0398, DAKO), ou avec les anticorps monoclonaux de souris anti-ox42 (MCA 275R, Serotec) dilués au 1/500^{ème} pour les coupes de cerveaux uniquement, pendant une nuit à 4°C. Les anticorps secondaires anti-lapin ou anti-souris respectivement sont déposés durant trois heures à température ambiante, après dilution dans du PBS contenant 5% de sérum bloquant de chèvre. L'utilisation du kit ABC (Vector) permet la fixation du complexe avidine-peroxydase puis, en présence du substrat diaminobenzidinetetrahydrochloride, l'activation de l'enzyme par du H₂O₂ pour induire un marquage brunâtre. Après avoir déshydraté les coupes, elles sont montées d'une lamelle avec de l'acrytol.

9. Statistiques

Nous avons effectué une analyse statistique à l'aide du logiciel SPSS® 15.0 pour Windows. Nous avons déterminé les valeurs moyennes (ou pourcentages) et les erreurs standards. L'analyse de variance (ANOVA) a été utilisée pour une comparaison de plus de deux groupes indépendants. Lorsque la différence était significative, une analyse *post-hoc* était réalisée grâce au test de Bonferroni. Le seuil de significativité pour les tests était de 5% ($p < 0,05$).

II. Etude clinique de cohorte : patients et méthode

Nous avons, rétrospectivement, analysé des données recueillies prospectivement chez 435 patients, qui présentaient une ischémie cérébrale et étaient recrutés dans l'unité neurovasculaire du CHRU de Lille : cohorte *Biostroke* (ClinicalTrials.gov Identifier : NCT00763217).

1. Critères d'inclusion et d'exclusion

La cohorte *Biostroke* inclut 477 patients ayant eu un AVC durant la période de juin 2005 à mai 2009. Elle inclut les AVC supra-tentoriels (y compris les AIT) dans un délai inférieur à 48 heures à partir du début des symptômes. Trente-neuf patients ayant une hémorragie intracérébrale, deux patients avec un statut inconnu vis à vis de la consommation d'alcool et un patient ayant une hémopathie lymphoïde chronique ont été exclus de l'étude. Au total, 435 patients ont été inclus dans l'analyse, parmi lesquels 105 ont reçu une thérapie thrombolytique.

2. Imagerie

Tous les patients ont été soumis à une imagerie cérébrale en urgence, soit par scanner (*Computed-Tomography* scan ; Siemens, Somatom Sensation 16 detectors, Erlangen, Allemagne), soit par IRM (Achieva Philips, 1.5T, avec FLAIR, gradient echo T2*, diffusion b1000 avec cartographie ADC et séquences TOF).

3. Evaluation clinique

La sévérité des AVC a été évaluée par le score NIHSS.²⁴⁴ Les critères TOAST ont été utilisés pour déterminer la cause présumée de l'ischémie cérébrale.²⁴⁵

4. Evaluation de la consommation excessive d'éthanol

L'évaluation de la consommation d'alcool était déclarative et déterminée après un entretien avec le patient. Nous avons considéré les patients « consommateurs excessifs » lorsque leur consommation hebdomadaire d'alcool est supérieure à 300g d'éthanol en routine, selon le critère utilisé par Deplanque *et al* (2006).²⁴⁶ Nous n'avons pas identifié de sous-groupe de patients « dépendants » parmi les « consommateurs excessifs ». Quand les cliniciens relevaient une contradiction entre les propos déclaratifs et les taux de TGP, de TGO, de γ GT et le volume globulaire moyen, ils vérifiaient la déclaration en questionnant un proche ou le médecin généraliste. La classification dans les catégories « consommateurs excessifs » ou « non-consommateurs excessifs » pouvait être modifiée jusqu'à la sortie du patient selon les informations reçues. Pour valider le diagnostic clinique, nous avons effectué un dosage quantitatif des CDT, dans le sérum d'un sous-groupe de patients inclus dans *Biostroke*. Les échantillons de sérum ont été maintenus à -20°C jusqu'à leur utilisation. Le dosage des CDT est exprimé en pourcentage parmi la totalité des transferrines. Les CDT ont

été mesurées par immuno-néphélométrie sensibilisée avec des particules sur les systèmes BN* et BN ProSpec® depuis le Kit N Latex CDT (*Siemens Healthcare Diagnostics, Marburg, Allemagne*). Si le dosage des CDT sériques était trop faible pour en déterminer la valeur exacte, nous avons utilisé la valeur la plus faible de l'ensemble de la cohorte. Les valeurs de CDT <2,1% ou >2,5% correspondent respectivement à un marqueur d'une faible ou excessive et chronique consommation d'alcool. Celles qui se situent entre 2,1% à 2,5% sont dans une aire d'incertitude.¹⁴²

Les marqueurs d'alcoolisme sont évalués par (i) leur sensibilité, c'est-à-dire leur probabilité d'avoir des faux négatifs, (ii) leur spécificité qui correspond à la probabilité d'avoir des faux positifs parmi les consommateurs excessifs décrétés et (iii) la valeur prédictive globale, la probabilité qu'une condition soit présente, en fonction du résultat du test. Le marqueur CDT a une sensibilité de 67%, une spécificité de 97% et une valeur prédictive globale de 84% pour un diagnostic d'abus d'alcool, ce qui est meilleur que les pourcentages retrouvés pour le volume globulaire moyen (respectivement 24%, 96% et 63%) et γ GT (respectivement 42%, 76% et 61%).²⁴⁷

5. Dosages plasmatiques des marqueurs inflammatoires

Les échantillons de sang ont été prélevés dans des tubes EDTA. Après centrifugation, le plasma des patients a été conservé à -80°C et décongelé juste avant la quantification de marqueurs inflammatoires. Le dosage de chacun des marqueurs a été réalisé à l'aide du kit standardisé de technologie multiplex de manière automatisée (Luminex®).

6. Statistiques

Nous avons effectué une analyse statistique à l'aide du logiciel SPSS® 15.0 pour Windows. Nous avons déterminé les valeurs médianes, les étendues interquartiles (IQR) et les pourcentages (%). Nous avons comparé les groupes au niveau des variables qualitatives, avec le test du Chi-2, avec la correction de Yates ou avec le test exact de Fisher si besoin. Pour les variables continues, le test U non paramétrique de Mann-Whitney pour une comparaison de deux groupes indépendants ou le test H de Kruskal-Wallis pour une comparaison de plus de deux groupes indépendants, a été utilisé. La première étape de l'analyse consistait à réaliser une comparaison bivariable des caractéristiques de base entre les patients consommateurs excessifs et les non-consommateurs excessifs. La deuxième étape de l'analyse était composée d'une comparaison bivariable des caractéristiques de bases, incluant la consommation d'alcool, des patients avec des AVC mineurs (score NIHSS

de 0 à 5) *versus* des AVC sévères (score NIHSS de 6 ou plus). Des tableaux croisés intégrant les deux variables qualitatives, la consommation excessive ou non et le fait d'avoir un NIHSS 0 à 5 ou de 6 ou plus, ont été réalisés afin de comparer les taux médians des marqueurs inflammatoires d'intérêt (PNN, ICAM-1 et VCAM-1) et les taux médians des marqueurs de lyse hépatocytaire (TGO et TGP). La troisième étape consistait en des analyses multivariées de régression logistique binaire avec « NIHSS 0 à 5 » comme variable dépendante. Nous avons calculé les odds ratios ajustés (AjOR), et l'intervalle de confiance à 95% (IC).²⁴⁸ Le choix de cette césure est fondé sur les analyses précédentes, étudiant la sévérité des AVC chez les patients admis dans notre centre et dans d'autres études.²⁴⁶ Les variables indépendantes ont été sélectionnées à partir de l'analyse bivariée, avec une éligibilité maximale de 0,25 comme critère de sélection des variables candidates.²⁴⁹ La variable "consommateurs excessifs" était forcée dans le modèle. Les corrélations entre les variables ont été vérifiées pour identifier les colinéarités (définies par un $r > 0,6$). Toutes les variables candidates, hors marqueurs inflammatoires, composaient le modèle statistique de base. Nous avons ajouté à l'analyse les variables candidates une à une, variables qui sont des marqueurs inflammatoires car les corrélations entre ces dernières étaient fortes.

7. Ethique

La cohorte *Biostroke* a été approuvée par le CCPRB de Lille et le patient, ou un parent proche, a donné un consentement écrit. Les patients ont été gérés selon les règles locales, sans aucune investigation ou traitement spécifiquement réalisé. L'étude a été entièrement et clairement expliquée aux patients. Ces derniers ont donné un consentement signé et éclairé pour les dosages. Ils ont reçu individuellement les résultats de leurs tests sanguins, sauf pour le dosage des CDT et des marqueurs inflammatoires (sauf les PNN), qui ne fait pas partie de l'analyse de routine dans notre centre et a été utilisé uniquement à des fins de recherche.

Résultats

I. Suivi des animaux

1. Suivi de la masse corporelle durant l'alcoolisation

La masse corporelle des rats est suivie chaque semaine à partir du premier jour de gavage (G1), jusqu'au jour de l'opération (G28). Les valeurs moyennes ne diffèrent pas entre chaque groupe de gavage à chaque temps de pesée (tableau 9).

Poids moyen (en g)	G1	G7	G14	G21	G28
VEH	119,6 ±1,6	167,4 ±1,6	215,5 ±2,3	242,3 ±3,2	289,1 ±2,5
A10	122,8 ±1,9	172,4 ±1,9	211,4 ±2,7	242,9 ±3,0	290,3 ±1,9
A35	120,5 ±1,9	168,4 ±2,0	211,4 ±2,8	247,7 ±3,1	295,7 ±3,0

Tableau 9 : Suivi de la masse corporelle des trois groupes de rats à 1, 7, 14, 21 et 28 jours de gavages(G).

2. Mortalité induite par le modèle d'alcoolisation et d'ischémie cérébrale.

Durant l'alcoolisation, 19,07% des rats A35 sont décédés. La mortalité suite à l'OACM et avant la mise à mort prévue pour les rats du protocole J1 s'est élevée à 26,14% pour le groupe IR VEH, à 33,33% pour le groupe IR A10 et à 39,7% pour le groupe IR A35. Concernant les rats prévus pour l'étude à J7, les pourcentages de mortalité sont respectivement 36,78%, 37,35% et 37,36%.

II. Caractérisation du modèle d'alcoolisation

1. Alcoolémie

Le taux moyen d'alcoolémie entre les deux gavages journaliers est significativement supérieur chez les rats A35 comparé à celui des rats A10, à G7, G14, G21 et G28 ($p < 0,001$ à chaque temps, figure 21).

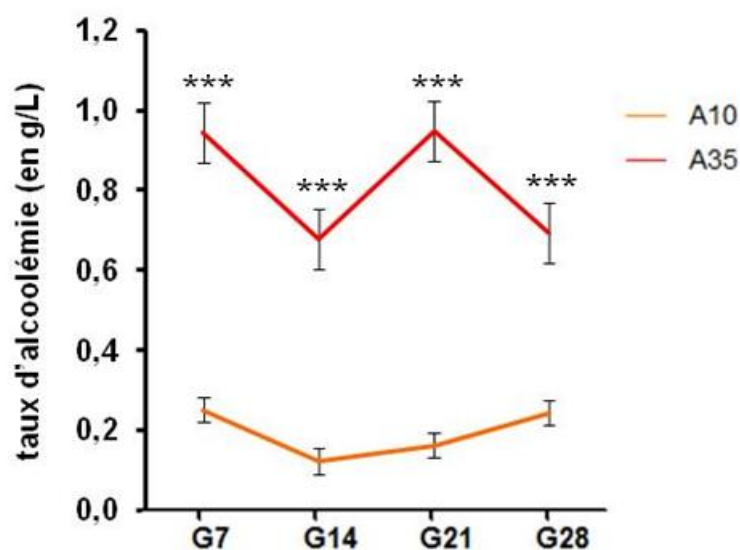


Figure 21 : Suivi de l'alcoolémie dans le sang des rats du groupe A10 et du groupe A35. *** $p < 0,001$. $n=5$ pour chaque groupe et chaque point.

2. Dosages plasmatiques des transaminases

Les dosages plasmatiques des enzymes TGO et TGP permettent de mettre en évidence la lyse hépatique suite à une consommation toxique d'éthanol. Après quatre semaines de gavage à la solution eau (VEH), A10 ou A35, les valeurs moyennes des dosages de ces deux enzymes dans le plasma des animaux NO sont rapportées dans le tableau 10 et ne diffèrent pas d'un groupe à l'autre.

	VEH	A10	A35	p global
TGO (en UI/L)	107,1 \pm 5,5	100,0 \pm 4,9	94,1 \pm 2,3	0,16
TGP (en UI/L)	44,7 \pm 3,0	34,5 \pm 3,0	38,0 \pm 4,1	0,12

Tableau 10 : Dosages plasmatiques des enzymes TGO et TGP pour les 3 groupes d'étude. $n_{VEH}=7$; $n_{A10}=8$; $n_{A35}=7$.

Les dosages ont également été effectués après l'induction de l'ischémie cérébrale à J1 et à J7 (figure 23 pour l'étude de TGP et figure 24 pour l'étude de TGO). Les valeurs moyennes des dosages de TGP et de TGO pour les rats IR ou NI à J1 sont significativement plus élevées que celles retrouvées avant l'opération dans chacun des groupes de gavage correspondant. A J7, les taux des deux types de transaminases des six groupes de rats sont similaires aux taux des rats NO (tableau 10, figures 22 et 23).

Les groupes d'animaux NI à J1 pour chaque protocole de gavage ont tendance à avoir des valeurs de dosages plasmatiques de TGP et de TGO moins élevées que les groupes IR correspondant au même protocole de gavage. La différence entre les taux moyens de TGO des animaux IR et des animaux NI est significative pour le groupe de rats A10 et A35 : $282, \pm 26,52$ UI/L pour le groupe NI A10 contre $426,7 \pm 54,57$ UI/L pour le groupe IR A10 ($p < 0,05$) et $282,6 \pm 22,61$ UI/L pour le groupe NI A35 contre $456,3 \pm 114,9$ UI/L pour le groupe IR A35 ($p < 0,05$).

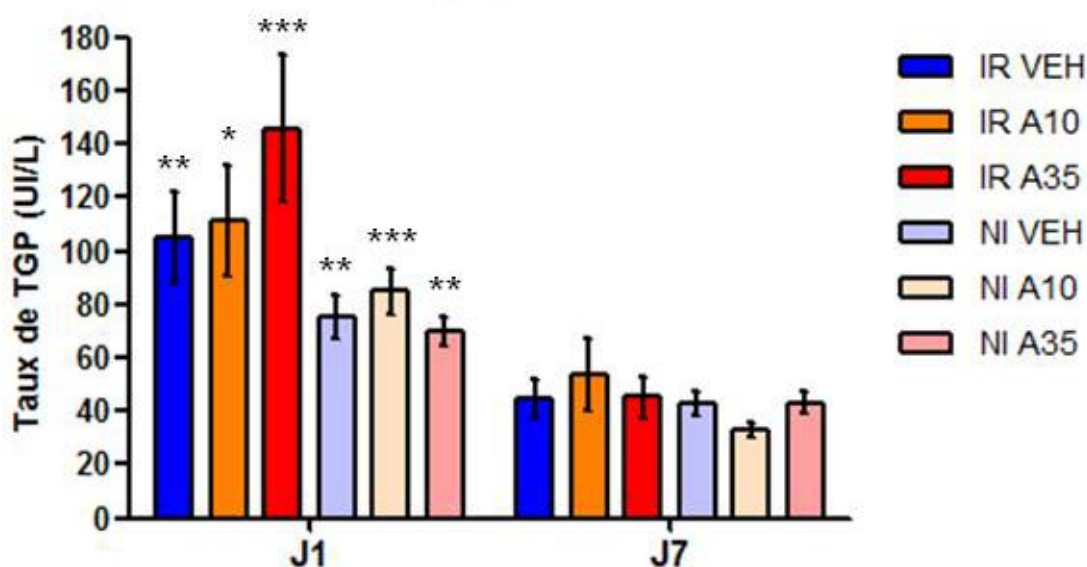


Figure 22 : Taux plasmatiques de TGP dans les 12 groupes d'études. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ vs le groupe correspondant à J7 (exemple : NI A10 à J1 vs NI A10 à J7). Effectifs à J1 : $n_{IR-VEH}=13$; $n_{IR-A10}=9$; $n_{IR-A35}=8$; $n_{NI-VEH}=6$; $n_{NI-A10}=5$; $n_{NI-A35}=8$. Effectifs à J7 : $n_{IR-VEH}=18$; $n_{IR-A10}=19$; $n_{IR-A35}=14$; $n_{NI-VEH}=6$; $n_{NI-A10}=14$; $n_{NI-A35}=20$.

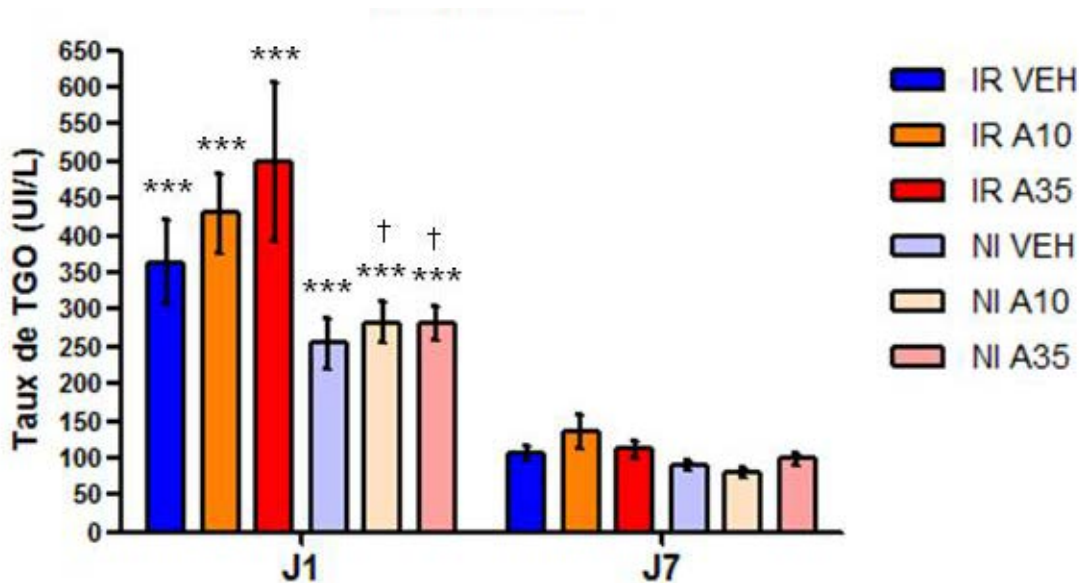


Figure 23 : Taux plasmatiques de TGO dans les 12 groupes d'études. *** $p < 0,001$ vs le groupe correspondant à J7 (exemple : NI A10 à J1 vs NI A10 à J7). $^{\dagger}p < 0,05$ vs le groupe IR (exemple : NI A10 à J1 vs IR A10 à J1). Effectifs à J1 : $n_{IR-VEH}=13$; $n_{IR-A10}=9$; $n_{IR-A35}=8$; $n_{NI-VEH}=6$; $n_{NI-A10}=5$; $n_{NI-A35}=8$. Effectifs à J7 : $n_{IR-VEH}=18$; $n_{IR-A10}=19$; $n_{IR-A35}=14$; $n_{NI-VEH}=6$; $n_{NI-A10}=14$; $n_{NI-A35}=20$

3. Poids du foie rapporté au poids du corps

La destruction tissulaire peut être approchée par une perte du poids de l'organe. Les ratios entre le poids du foie et celui du corps des rats sont rapportés dans la figure 24. Aucune différence n'a été notée entre chaque groupe de gavage, ni à J1, ni à J7.

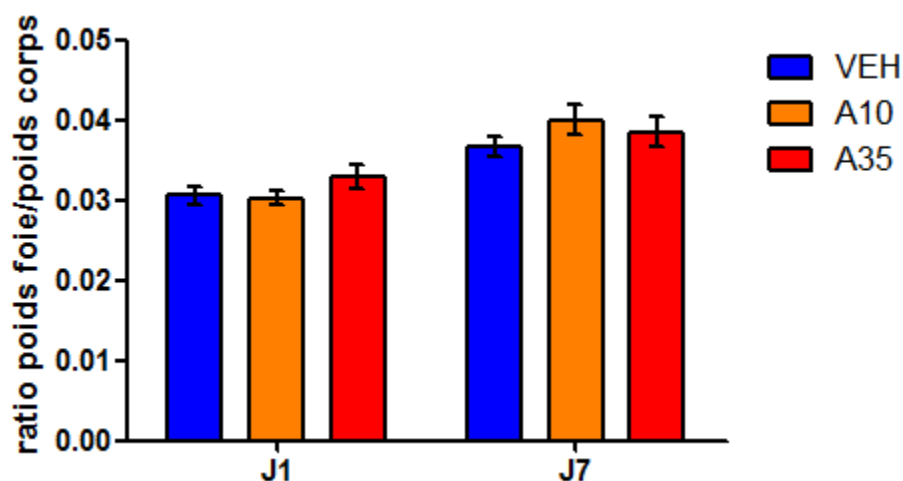


Figure 24 : Ratio du poids du foie sur le poids du corps pour les 3 groupes de gavages à J1 et à J7. Effectifs à J1 : $n_{IR-VEH}=12$; $n_{IR-A10}=9$; $n_{IR-A35}=7$. Effectifs à J7 : $n_{IR-VEH}=9$; $n_{IR-A10}=8$; $n_{IR-A35}=6$.

4. Stéatose hépatique

Le nombre de gouttelettes lipidiques, caractérisant la stéatose hépatique, est significativement plus élevé dans le groupe A10 ($141,0 \pm 20,95$ gouttelettes ; $p < 0,01$) et dans le groupe A35 ($245,5 \pm 26,94$; $p < 0,001$) comparés respectivement au nombre moyen du groupe VEH ($63,85 \pm 6,03$), à J1 soit le lendemain de la période de gavage. Une différence significative du nombre moyen de gouttelettes est notée entre le groupe A10 et le groupe A35 à J1 uniquement (figure 25 ; $p < 0,05$).

A une semaine de sevrage éthylique, une diminution importante de la stéatose lipidique dans les deux groupes de rats alcoolisés est observée avec un seuil de significativité inférieur à 1% : $91,38 \pm 9,86$ pour le groupe A10 et $135,6 \pm 21,40$ pour le groupe A35 (figures 25 et 26). Cependant, le nombre moyen d'amas lipidiques hépatiques dans les groupes A10 et A35 est encore significativement supérieur au groupe VEH ($p < 0,01$ vs A10 et vs A35).

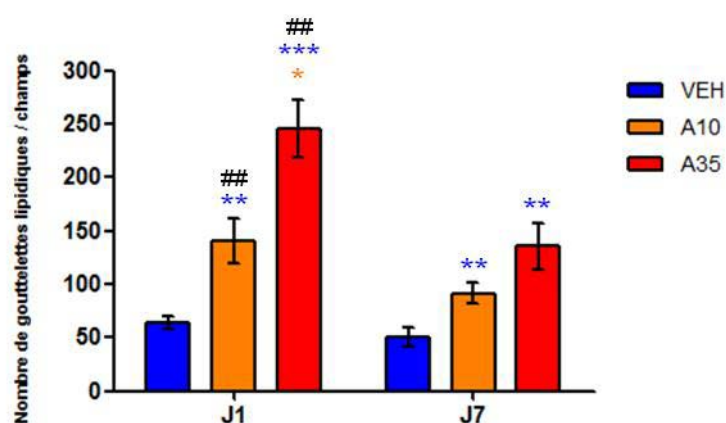


Figure 25 : Accumulation des gouttelettes lipidiques dans le foie des rats à J1 et à J7. * $p < 0,05$ (vs le groupe A10 dans le protocole de cinétique correspondant) ; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ (vs le groupe VEH dans le protocole de cinétique correspondant); ## $p < 0,01$ (vs le même groupe correspondant à J7). Effectifs à J1 : $n_{IR-VEH}=13$; $n_{IR-A10}=11$; $n_{IR-A35}=6$. Effectifs à J7 : $n_{IR-VEH}=11$; $n_{IR-A10}=16$; $n_{IR-A35}=11$.

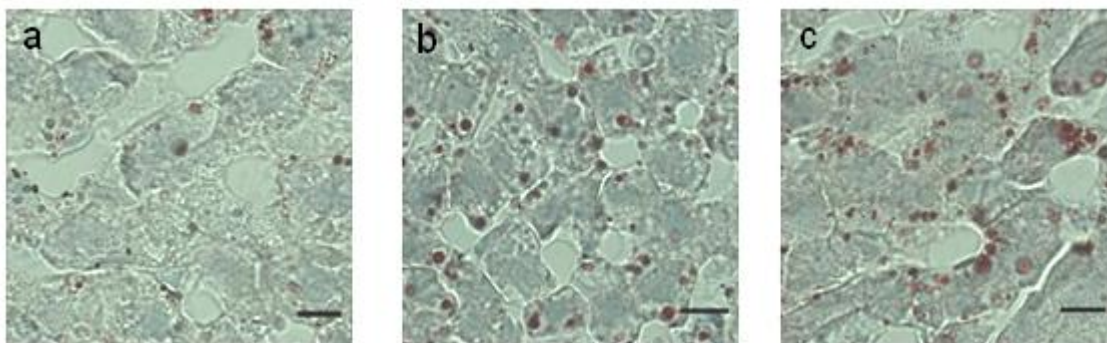


Figure 26 : Illustration des gouttelettes lipidiques à J7 dans le foie d'un rat VEH (a), d'un rat A10 (b) et d'un rat A35 (c).

III. Sévérité de l'ischémie cérébrale : volume de l'infarctus et déficits neurologiques et fonctionnels

1. Analyse histomorphométrique

L'analyse histomorphométrique à J1 et à J7 permet de suivre le profil volumétrique de la totalité de l'infarctus cérébral, de la zone corticale et la zone sous-corticale dans le temps (figure 27 pour l'étude à J1 et figure 28 pour l'étude à J7). A J1, les augmentations du VITc observées dans les cerveaux des rats IR A10 ($299,6 \pm 11,5 \text{ mm}^3$) et celui des rats IR A35 ($318,1 \pm 10,4 \text{ mm}^3$) sont significativement différents, comparées au volume moyen des rats IR VEH ($257,2 \pm 11,7 \text{ mm}^3$). Le VICc est également plus conséquent dans les deux groupes de rats alcoolisés : $188,0 \pm 12,36 \text{ mm}^3$ pour le groupe IR VEH, $226,6 \pm 11,43 \text{ mm}^3$ pour le groupe IR A10 ($p < 0,05$) et $238,6 \pm 10,02 \text{ mm}^3$ pour le groupe IR A35 ($p < 0,05$). Le VISc est comparativement différent entre le groupe IR VEH ($69,19 \pm 3,2 \text{ mm}^3$) et le groupe IR A35 ($79,48 \pm 1,80 \text{ mm}^3$) ($p < 0,05$). Celui du groupe IR A10 avec sa valeur intermédiaire à $72,91 \pm 3,38 \text{ mm}^3$, ne permet pas de se distinguer le VISc de l'un des deux autres groupes de gavages. L'œdème est également significativement majoré dans les groupes de rats alcoolisés ($135,1 \pm 11,33 \text{ mm}^3$ pour le groupe IR A10 et $144,2 \pm 15,49 \text{ mm}^3$ pour le groupe IR A35) comparé au VO du groupe IR VEH ayant pour valeur $79,84 \pm 10,13 \text{ mm}^3$ ($p < 0,01$).

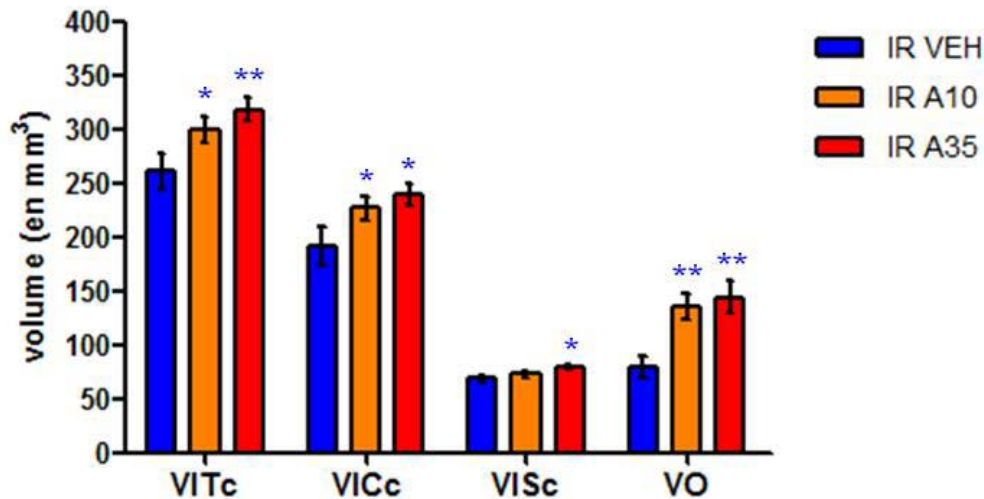


Figure 27 : Effet de l'administration chronique d'éthanol A10 et A35 sur le volume d'infarctus et le volume approché d'œdème chez le rat à J1. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ (vs le groupe IR VEH). $n_{IR-VEH}=12$; $n_{IR-A10}=9$; $n_{IR-A35}=7$. VICc : volume d'infarctus cortical ; VISc : volume d'infarctus sous-cortical (striatal) ; VITc : volume d'infarctus total ; VO : volume approché de l'œdème cérébral

A J7, les volumes moyens de l'infarctus et les volumes moyens de l'œdème sont significativement réduits respectivement dans chacun des groupes de gavages ($p < 0,001$), comparés aux volumes à J1 (figures 27 et 28). Cependant, la différence de VITc et VICc entre les groupes IR VEH et IR A35 persiste avec des valeurs atteignant $173 \pm 11,73 \text{ mm}^3$ et $208,6 \pm 12,04 \text{ mm}^3$ concernant le VITc et $131,9 \pm 10,74 \text{ mm}^3$ ($p < 0,01$), et $179,2 \pm 13,34 \text{ mm}^3$ concernant le VICc ($p < 0,05$).

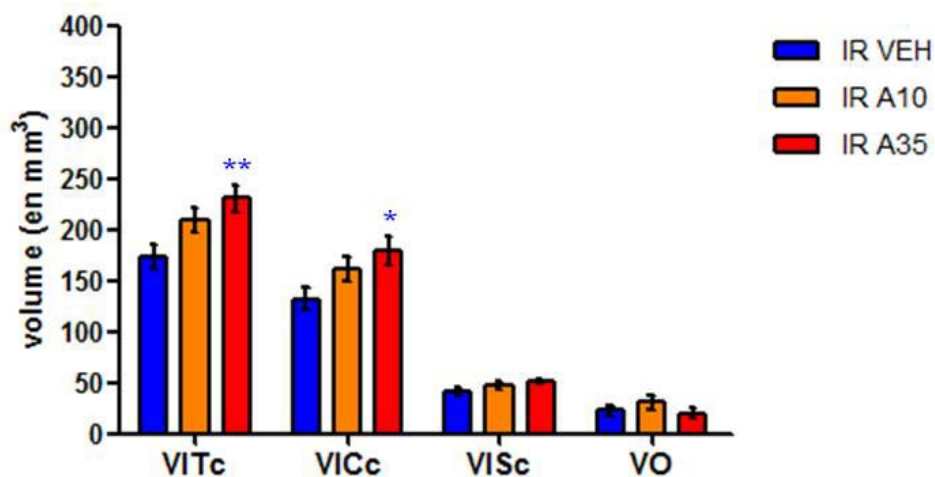


Figure 28 : Volume d'infarctus et le volume d'œdème dans les trois groupes IR à J7. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ (vs le groupe IR VEH). $n_{IR-VEH}=9$; $n_{IR-A10}=8$; $n_{IR-A35}=6$. VICc : volume d'infarctus cortical ; VISc : volume d'infarctus sous-cortical (striatal) ; VITc : volume d'infarctus total ; VO : volume approché de l'œdème cérébral.

2. Déficits neurologiques

Les résultats de l'évaluation des déficits neurologiques par le neuroscore de Bederson sont cohérents avec les résultats de l'analyse histomorphométrique des volumes de l'infarctus cérébral dans chacun des groupes IR à J1 et à J7 (figures 27, 28 et 29). Les rats NI à J1 et à J7 obtiennent tous le score minimal de 0, ce qui les distingue significativement des rats IR de chaque groupe de gavage correspondant ($p < 0,001$). Le score moyen retrouvé dans le groupe IR A35 à J1 s'élève à $2,88 \pm 0,34$ contre $1,80 \pm 0,29$ pour le groupe IR VEH à J7 ($p < 0,01$; figure 29). Bien que les scores pour les trois groupes de gavages diminuent significativement à J7 ($p < 0,001$), le score du groupe IR A35 ($1,25 \pm 0,30$) se distingue encore de celui du groupe IR VEH ($0,56 \pm 0,15$; $p < 0,05$).

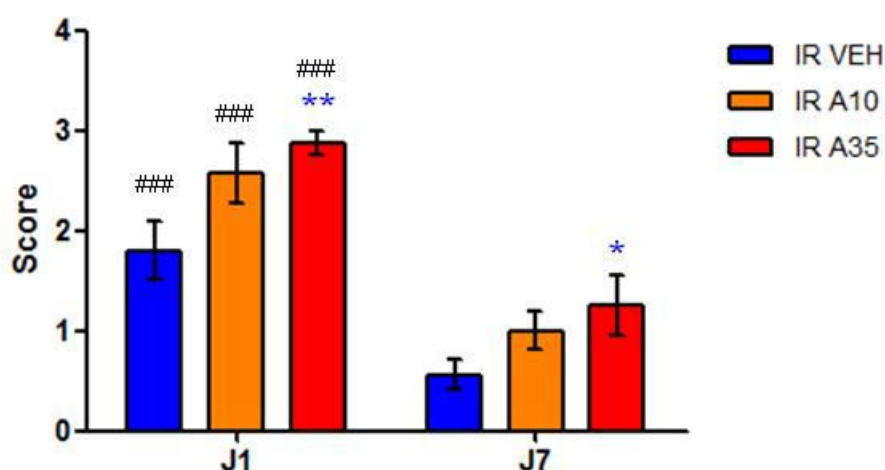


Figure 29 : Score de Bederson pour les trois groupes IR à J1 et J7. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ (vs le groupe IR VEH au même temps d'étude). ### $p < 0,001$ (vs le même groupe correspondant à J7). Effectifs à J1 : $n_{IR-VEH}=10$; $n_{IR-A10}=7$; $n_{IR-A35}=8$. Effectifs à J7 : $n_{IR-VEH}=16$; $n_{IR-A10}=15$; $n_{IR-A35}=12$.

3. Déficits fonctionnels

A. Test de l'actimètre

Les données de l'actimétrie sont affichées dans la figure 30. Les rats NI à J1 et à J7 ne présentent pas de troubles moteurs. Aucune différence significative n'est notée entre les groupes de gavages. Les animaux NI à J7 parcourent plus de distance que les rats NI de J1.

La locomotion spontanée est hautement perturbée après l'OACM à J1 dans les trois groupes. Les distances parcourues à J1 sont de $457,5 \pm 107,8m$ pour le groupe IR VEH contre $1928 \pm 423,1m$ pour le groupe NI VEH ($p < 0,001$), $431,3 \pm 97,78m$ le groupe IR A10

contre $2380 \pm 220,9\text{m}$ ($p < 0,001$), et $654,5 \pm 200,7\text{m}$ pour le groupe IR A35 contre $2709 \pm 431,8\text{m}$ pour le groupe NI A35 ($p < 0,001$). A J7, les valeurs des rats IR sont nettement augmentées et sont similaires à celles des rats NI. Le traitement chronique à l'éthanol n'a pas induit un déficit moteur plus marqué (p (global IR J1)=0,504).

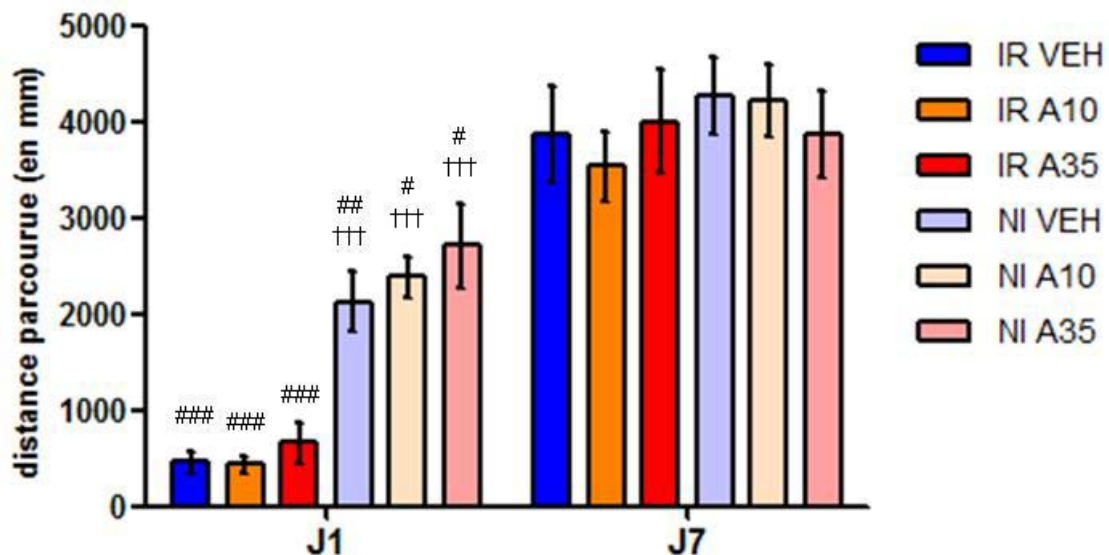


Figure 30 : Distance parcourue pour les 12 groupes d'étude. # $p < 0,05$; ## $p < 0,01$; ### $p < 0,001$ (vs le même groupe correspondant à J7). † $p < 0,05$; †† $p < 0,001$ (vs le groupe IR du même protocole de gavage, au même temps d'étude). Effectifs à J1 : $n_{IR-VEH}=13$; $n_{IR-A10}=9$; $n_{IR-A35}=8$; $n_{NI-VEH}=6$; $n_{NI-A10}=5$; $n_{NI-A35}=8$. Effectifs à J7 : $n_{IR-VEH}=18$; $n_{IR-A10}=19$; $n_{IR-A35}=14$; $n_{NI-VEH}=6$; $n_{NI-A10}=14$; $n_{NI-A35}=20$.

B. Test de préhension

Les résultats du test de préhension sont illustrés dans la figure 31. Le traitement à l'éthanol n'a pas induit de troubles, les groupes de rats ont des valeurs similaires à J1 et à J7.

Une perte de la dextérité et de la force musculaire des pattes supérieures des rats IR à J1 sont mises en évidence, en comparaison des rats NI: $2,10 \pm 0,36$ points pour le groupe IR VEH contre $3,67 \pm 0,23$ pour le groupe NI VEH ($p < 0,05$) ; $1,62 \pm 0,17$ pour le groupe IR A10 contre $3,89 \pm 0,24$ pour le groupe NI A10 ($p < 0,001$) ; $1,06 \pm 0,06$ pour le groupe IR A35 contre $3,77 \pm 0,15$ pour le groupe NI A35 ($p < 0,001$). Ce trouble musculaire persiste à J7, à moindre intensité pour les rats alcoolisés, comparés aux rats NI de chaque groupe de gavages : $2,57 \pm 0,30$ points pour le groupe IR VEH contre $3,36 \pm 0,23$ pour le groupe NI VEH ($p < 0,05$) ; $2,57$

$\pm 0,30$ pour le groupe IR A10 contre $3,43 \pm 0,18$ pour le groupe NI A10 ($p < 0,05$) ; $2,85 \pm 0,33$ pour le groupe IR A35 contre $3,56 \pm 0,18$ pour le groupe NI A35 ($p < 0,05$).

Le score du groupe IR A35 est significativement plus bas que celui du groupe IR VEH ($p < 0,05$). A J7, les scores moyens des trois groupes de gavages sont équivalents, ce qui met en évidence une récupération significative de la fonction musculaire des pattes supérieures des rats IR A35, comparés au score moyen des rats IR A35 à J1 (score de $2,847 \pm 0,33$; $p < 0,05$).

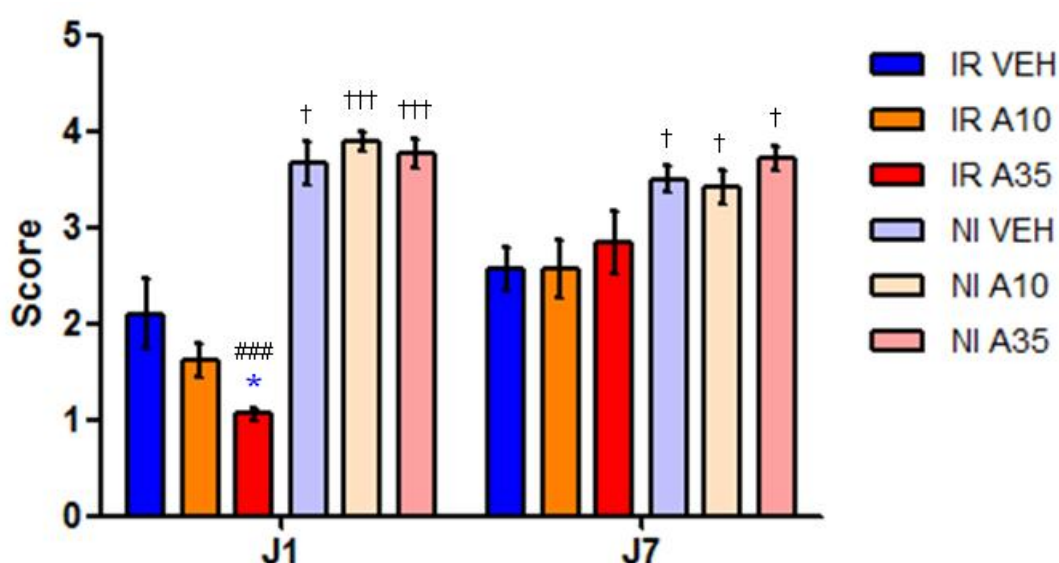


Figure 31 : Score du test de préhension en fonction du temps de suspension par les pattes supérieures de l'animal pour les 12 groupes d'étude. * $p < 0,05$ (vs le groupe IR VEH au même temps d'étude). ### $p < 0,001$ (vs le même groupe correspondant à J7). † $p < 0,05$; ††† $p < 0,001$ (vs le groupe IR du même protocole de gavage, au même temps d'étude). Effectifs à J1 : $n_{IR-VEH}=10$; $n_{IR-A10}=7$; $n_{IR-A35}=8$; $n_{NI-VEH}=4$; $n_{NI-A10}=3$; $n_{NI-A35}=5$. Effectifs à J7 : $n_{IR-VEH}=16$; $n_{IR-A10}=15$; $n_{IR-A35}=12$; $n_{NI-VEH}=12$; $n_{NI-A10}=11$; $n_{NI-A35}=13$.

C. Test de retrait du ruban adhésif

La figure 32 représente les résultats pour le test de retrait du ruban adhésif. Les valeurs pour les six groupes d'animaux NI sont sans exception de cinq points, score maximal.

La sensorimotricité des animaux IR est temporairement perturbée à J1 puisque les scores du test du retrait du ruban adhésif sont significativement diminués pour les trois groupes de gavages. A J7, les scores moyens s'élèvent à $4,50 \pm 0,58$ pour le groupe IR VEH ($p < 0,001$ vs J1), à $3,88 \pm 0,25$ pour le groupe IR A10 ($p < 0,001$ vs J1), et à $3,91 \pm 0,40$ pour le groupe IR A35 ($p < 0,001$ vs J1), ce qui montre une récupération sensori-motrice notable.

D'autre part, le score moyen est significativement plus faible à $0,33 \pm 0,16$ pour les rats IR A35 comparé aux rats IR VEH ayant un score moyen de $1,82 \pm 0,58$ ($p < 0,05$). A J7, cette différence disparaît.

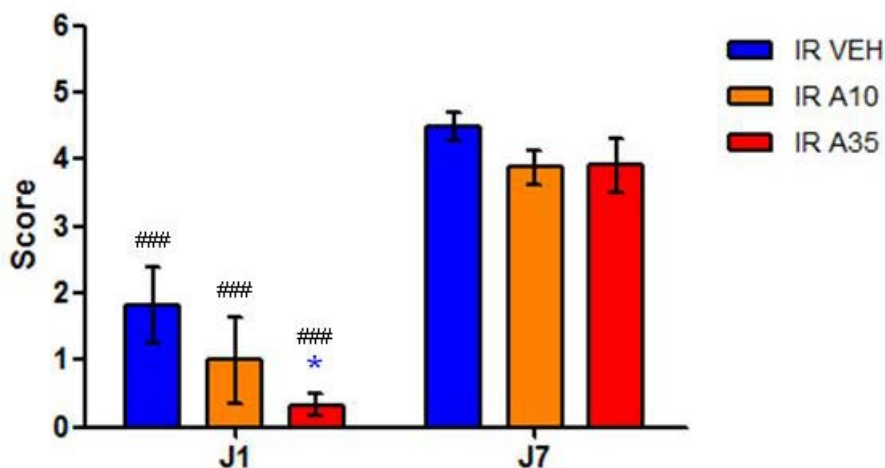


Figure 32 : Score du test du retrait d'adhésif pour les groupes d'animaux IR à J1 et à J7. * $p < 0,05$ (vs le groupe IR VEH au même temps d'étude). ### $p < 0,001$ (vs le même groupe correspondant à J7). Effectifs à J1 : $n_{IR-VEH}=9$; $n_{IR-A10}=7$; $n_{IR-A35}=8$. Effectifs à J7 : $n_{IR-VEH}=15$; $n_{IR-A10}=14$; $n_{IR-A35}=11$.

D. Test de l'accélération de vitesse

Les résultats pour le test de l'accélération de vitesse sur le rotarod sont rapportés dans la figure 33. Les six groupes de rats NI présentent des pertes de motricité mineures, négligeables.

A J1, des troubles des fonctions motrice et coordinatrice, par rapport aux performances acquises avant l'opération, apparaissent suite à l'OACM dans les groupes IR VEH ($62,43 \pm 11,40\%$, $p < 0,001$), IR A10 ($77,45 \pm 13,03\%$, $p < 0,001$) et IR A35 ($90,83 \pm 4,68\%$, $p < 0,001$), comparés aux groupes NI respectifs. A J7, les capacités motrices sur la rampe d'accélération des rats IR sont significativement meilleures, comparées à celles enregistrées à J1.

A J1, le pourcentage moyen de perte motrice est significativement plus élevé pour le groupe IR A35, comparé au groupe IR VEH ($p < 0,05$). A J7, le groupe IR A35 présente un pourcentage de perte similaire aux deux autres groupes : $30,92 \pm 8,60\%$ pour le groupe IR VEH, $38,49 \pm 10,35\%$ pour le groupe IR A10 et $33,75 \pm 11,30\%$ pour le groupe IR A35.

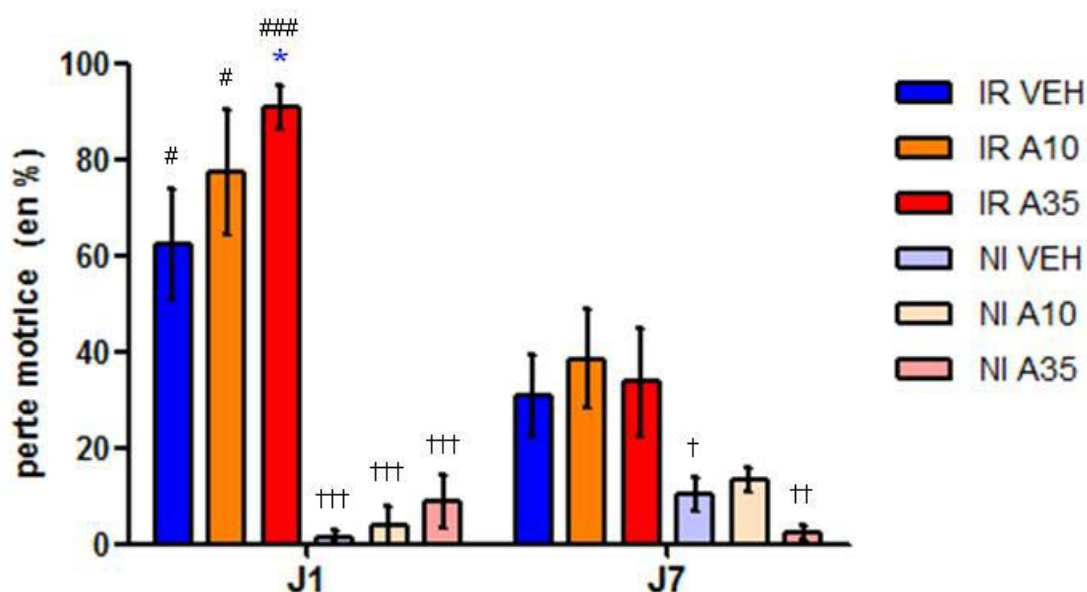


Figure 33 : Perte motrice suite à un apprentissage pour les 12 groupes d'étude. * $p < 0,05$ (vs le groupe IR VEH au même temps d'étude). # $p < 0,05$; ### $p < 0,001$ (vs le même groupe correspondant à J7). † $p < 0,05$; †† $p < 0,01$; ††† $p < 0,001$ (vs le groupe IR du même protocole de gavage, au même temps d'étude). Effectifs à J1 : $n_{IR-VEH}=8$; $n_{IR-A10}=7$; $n_{IR-A35}=7$; $n_{NI-VEH}=4$; $n_{NI-A10}=3$; $n_{NI-A35}=5$. Effectifs à J7 : $n_{IR-VEH}=10$; $n_{IR-A10}=13$; $n_{IR-A35}=10$; $n_{NI-VEH}=10$; $n_{NI-A10}=11$; $n_{NI-A35}=13$.

IV. Impact de la sévérité de l'ischémie cérébrale sur l'immunité innée : rôle de l'activation microgliale et des polynucléaires neutrophiles

1. Activation microgliale

Les résultats concernant l'activation microgliale dans notre modèle sont représentés dans la figure 34. Le nombre de cellules positives ox-42, marqueur caractérisant la microglie activée, est nul dans le cerveau des rats NI, alcoolisés ou non, à J1 et à J7.

Suite à l'OACM, une activation microgliale majeure survient à J1 dans l'hémisphère droit ischémié des rats des groupes NI avec des valeurs moyennes de $14,56 \pm 1,95$ cellules positives ox-42 pour le groupe IR VEH, $22,54 \pm 3,01$ pour le groupe IR A10 et $33,56 \pm 4,19$ pour le groupe IR A35. A J7, les trois groupes de gavages présentent un nombre de cellules positives ox-42, similaire aux valeurs moyennes retrouvées à J1 : $17,66 \pm 1,042$ cellules positives pour le groupe IR VEH, $22,10 \pm 1,53$ pour le groupe IR A10 et $37,90 \pm 4,43$ pour le groupe IR A35 (figure 35).

L'administration préalable chronique d'éthanol à moyenne ou haute dose suivie d'une ischémie cérébrale transitoire induit une augmentation significative des cellules microgliales activées, comparée au groupe IR VEH ($p<0,05$ vs IR A10, $p<0,001$ vs IR A35). Un effet-dose est notable par la différence de niveau de significativité de l'analyse comparative des deux groupes de rats alcoolisés avec le groupe de rats véhicules. Cependant, le nombre moyen de cellules microgliales activées du groupe IR A35 n'est pas clairement plus élevé par rapport à celui du groupe IR A10 ($p=0,058$). A J7, le groupe IR A35 a conservé un niveau plus élevé de cellules positives ox-42 par mm^2 que celui du groupe IR VEH et semble se distinguer du groupe IR A10 avec un seuil de significativité inférieur à 0,1%.

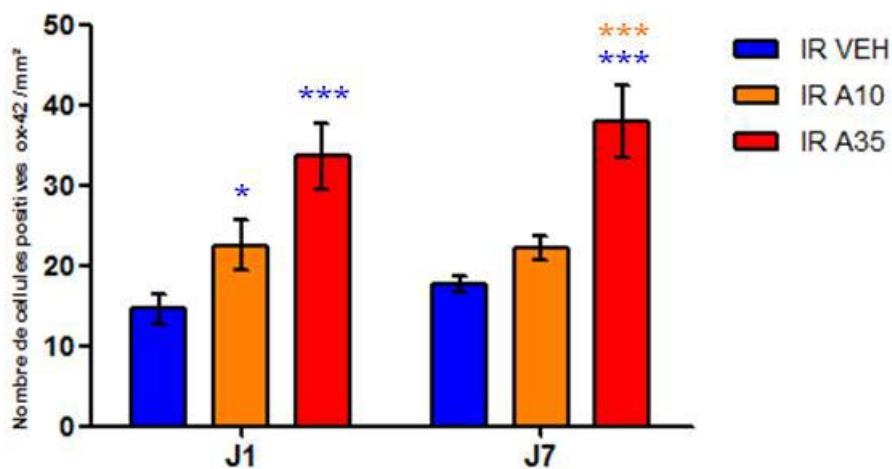


Figure 34 : Activation de la microglie dans la zone infarctée du cerveau dans les six groupes IR d'études. *** $p<0,001$ (vs le groupe IR A10 dans le protocole de cinétique correspondant). * $p<0,05$; *** $p<0,001$ (vs le groupe IR VEH dans le protocole de cinétique correspondant). Effectifs à J1 : $n_{\text{IR-VEH}}=11$; $n_{\text{IR-A10}}=10$; $n_{\text{IR-A35}}=7$. Effectifs à J7 : $n_{\text{IR-VEH}}=8$; $n_{\text{IR-A10}}=10$; $n_{\text{IR-A35}}=8$.

2. Infiltration des polynucléaires neutrophiles dans le cerveau

A. Analyse du nombre de polynucléaires neutrophiles infiltrés dans le parenchyme cérébral infarcté

La figure 35 est composée des données de l'analyse du nombre de PNN infiltrés dans le cerveau infarcté. Les groupes NI VEH, NI A10 et NI A35 ne présentent aucun PNN infiltré dans leur parenchyme cérébral, ni à J1, ni à J7. A J1 et J7, le nombre de PNN caractérisés par un marquage à la MPO et infiltrés dans le parenchyme ischémié du cerveau est augmenté dans chaque groupe IR comparé au groupe NI.

A J1, le nombre moyen de cellules positives MPO, est plus important dans la zone infarctée des rats du groupe IR A35 ($37,86 \pm 5,08$ cellules positives), que dans celle des rats du groupe IR VEH ($16,43 \pm 2,82$ cellules positives ; $p < 0,01$) ou dans celle des rats du groupe IR A10 ($24,35 \pm 3,78$ cellules positives; $p < 0,05$) (figure 36).

A J7, les nombres moyens de PNN infiltrés varient peu dans chacun des groupes de gavages par rapport aux valeurs à J1 : $16,23 \pm 3,61$ cellules positives MPO pour le groupe IR VEH, $24,80 \pm 3,07$ cellules positives pour le groupe IR A10, $42,66 \pm 5,63$ cellules pour le groupe IR A35 (figure 36). Le nombre moyen de PNN infiltrés dans la zone infarctée des rats IR VEH se distingue encore de celui du groupe IR VEH ($p < 0,001$) et de celui du groupe IR A10 ($p < 0,01$) avec un niveau de significativité supérieur par rapport à l'analyse statistique faite à J1.

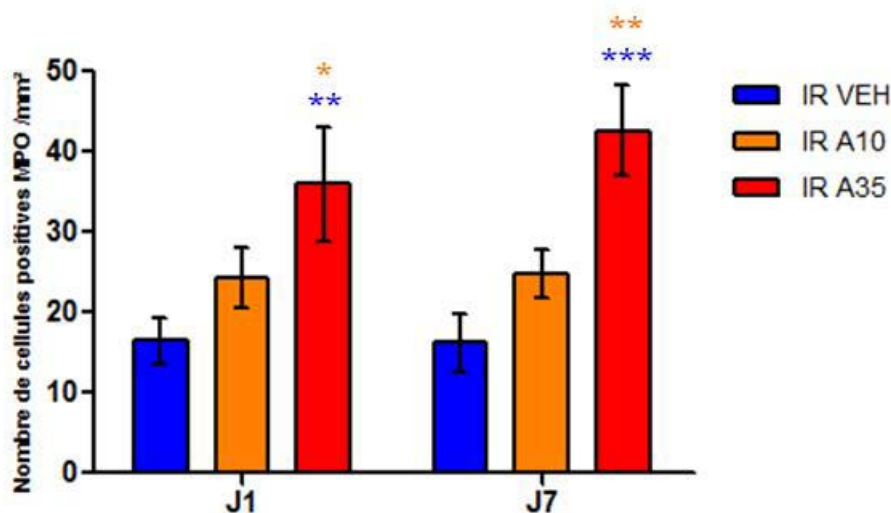


Figure 35 : Infiltration des polynucléaires neutrophiles dans la zone infarctée du cerveau dans les six groupes IR d'études. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ (vs le groupe IR A10 dans le protocole de cinétique correspondant). ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ (vs le groupe IR VEH dans le protocole de cinétique correspondant). Effectifs à J1 : $n_{IR-VEH}=11$; $n_{IR-A10}=10$; $n_{IR-A35}=7$. Effectifs à J7 : $n_{IR-VEH}=8$; $n_{IR-A10}=10$; $n_{IR-A35}=8$.

B. Analyse de l'expression génique des protéines d'adhésion leucocytaire dans l'hémisphère droit : ICAM-1 et VCAM-1

L'expression génique, caractérisée par le taux d'expression d'ARNm, a été mesurée dans trois zones cérébrales de l'hémisphère droit : cortex, hippocampe et striatum. Elles ont été rapportées en pourcentage en fonction du groupe NI VEH du protocole de cinétique correspondant (J1 ou J7).

i. Analyse de l'expression génique de ICAM-1 et de VCAM-1 dans le cortex de l'hémisphère ipsilatéral

Les taux d'expression génique d'ICAM-1 dans le cortex droit des rats des 12 groupes d'étude sont rapportés dans la figure 36. A J1, le taux d'expression génique d'ICAM-1 dans le cortex du groupe NI A35 est plus élevé que celui des deux autres groupes NI ($p < 0,01$ vs NI VEH ; $p < 0,01$ vs NI A10). A J7, ces taux varient peu. La différence statistique persiste entre le groupe NI VEH et le groupe NI A35 ($p < 0,05$). Les taux d'expression génique d'ICAM-1 dans le cortex droit des rats IR sont significativement supérieurs aux taux mesurés dans le cortex des rats NI à J1. Ces différences statistiques sont encore constatées à J7, malgré une diminution manifeste des taux dans le cortex ipsilatéral des groupes IR. Dans le sous-ensemble de rats IR à J1, le groupe IR VEH présente un taux moyen d'expression génique d'ICAM-1 au sein du cortex ischémié égal à $538,5 \pm 75,32\%$, nettement plus faible comparé à celui du groupe IR A10 ($1005 \pm 86,04\%$; $p < 0,001$) et celui du groupe IR A35 ($1041 \pm 75,12\%$; $p < 0,001$). A J7, le taux moyen du groupe IR A35 est plus élevé comparé à celui du groupe IR VEH ($p < 0,05$). La diminution des taux, pour l'étude des rats IR entre J1 et J7, est significative pour les trois groupes de gavages respectifs ($p < 0,001$ IR VEH; $p < 0,001$ IR A10; $p < 0,001$ IR).

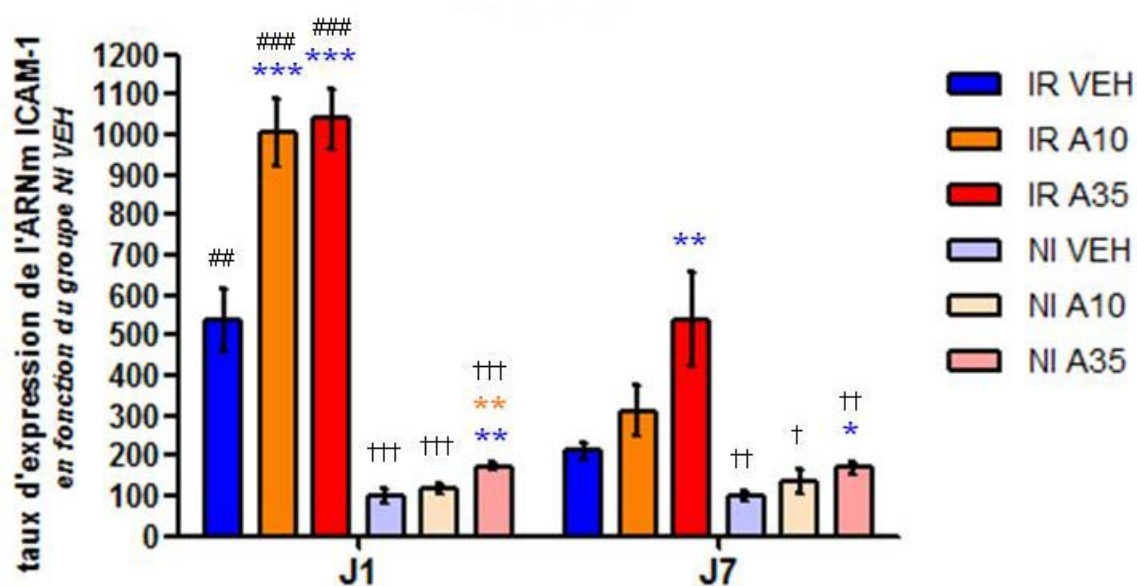


Figure 36 : Expression génique d'ICAM-1 dans le cortex droit dans les 12 groupes d'étude. * $p < 0,01$ (vs le groupe IR A10 dans le protocole de cinétique correspondant). * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ (vs le groupe IR VEH au même temps d'étude). ## $p < 0,01$; ### $p < 0,001$ (vs le même groupe correspondant à J7). † $p < 0,05$; †† $p < 0,01$; ††† $p < 0,001$ (vs le groupe IR du même protocole de gavage, au même temps d'étude). Effectifs à J1 : $n_{IR-VEH}=11$; $n_{IR-A10}=8$; $n_{IR-A35}=10$; $n_{NI-VEH}=7$; $n_{NI-A10}=6$; $n_{NI-A35}=5$. Effectifs à J7 : $n_{IR-VEH}=10$; $n_{IR-A10}=7$; $n_{IR-A35}=6$; $n_{NI-VEH}=5$; $n_{NI-A10}=3$; $n_{NI-A35}=6$.

Les taux d'expression génique de VCAM-1 dans le cortex droit des rats des 12 groupes d'étude sont rapportés dans la figure 37. A J1, le taux moyen d'expression génique de

VCAM-1 dans le cortex droit des animaux du groupe NI A35 est significativement plus élevé comparé à celui du groupe NI VEH ($p<0,05$). A J7, ces taux ne varient pas pour le groupe NI VEH et le groupe NI A10. Le groupe NI A35 présente un taux moyen de $96,58 \pm 6,59\%$ significativement moins élevé comparé au taux mesuré à J1 pour ce groupe ($p<0,05$).

Les taux d'expression génique de VCAM-1 dans le cortex de l'hémisphère ipsilatéral des rats IR sont significativement supérieurs aux taux mesurés dans le cortex des rats NI à J1 dans chacun des groupes de gavages.

Dans le sous-ensemble de rats IR à J1, le groupe IR VEH présente un taux moyen de $283,6 \pm 33,48\%$ au sein du cortex ischémié, ce qui est nettement plus faible comparé à celui du groupe IR A10 ($331,7 \pm 48,48\%$; $p<0,001$) et celui du groupe IR A35 ($396,6 \pm 22,88\%$; $p<0,001$). Une diminution manifeste des taux dans le cortex ipsilatéral des groupes IR est observée et approche les valeurs NI à J7.

La diminution des taux, pour l'étude des rats IR entre J1 et J7, est significative pour les trois groupes de gavages respectifs ($p<0,001$ IR VEH; $p<0,001$ IR A10; $p<0,001$ IR A35).

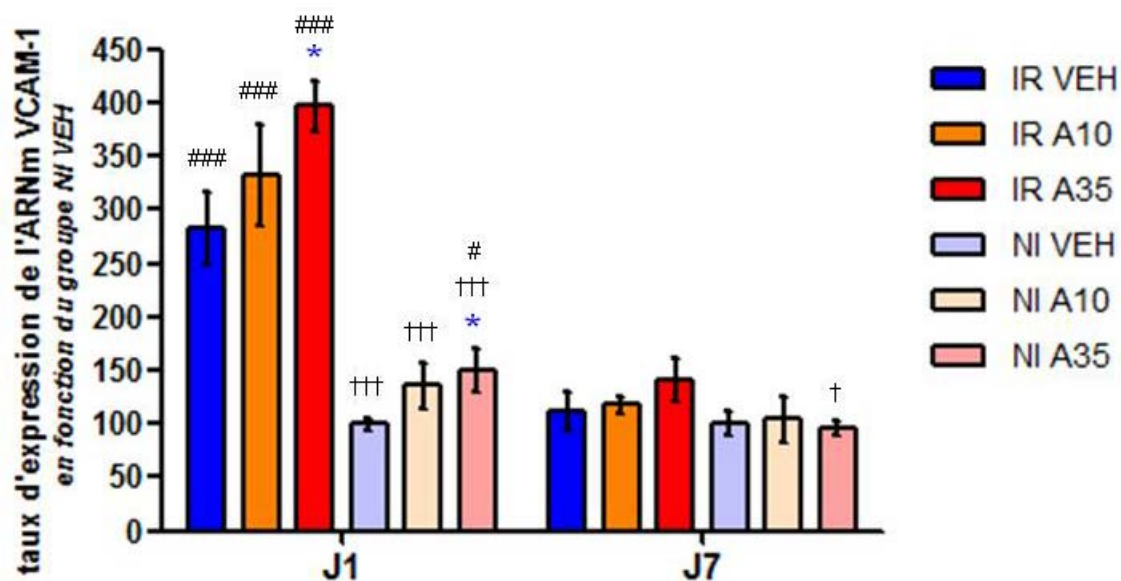


Figure 37 : Expression génique de VCAM-1 dans le cortex droit dans les 12 groupes d'étude. * $p<0,05$ (vs le groupe IR VEH au même temps d'étude). # $p<0,05$; ### $p<0,001$ (vs le même groupe correspondant à J7). † $p<0,05$; ††† $p<0,001$ (vs le groupe IR du même protocole de gavage, au même temps d'étude). Effectifs à J1 : $n_{IR-VEH}=11$; $n_{IR-A10}=8$; $n_{IR-A35}=10$; $n_{NI-VEH}=7$; $n_{NI-A10}=6$; $n_{NI-A35}=5$. Effectifs à J7 : $n_{IR-VEH}=10$; $n_{IR-A10}=7$; $n_{IR-A35}=6$; $n_{NI-VEH}=5$; $n_{NI-A10}=3$; $n_{NI-A35}=6$.

ii. Analyse de l'expression génique de ICAM-1 et de VCAM-1 dans le striatum de l'hémisphère ipsilatéral

Les taux d'expression génique d'ICAM-1 dans le striatum droit des rats des 12 groupes d'étude sont illustrés dans la figure 38. A J1, le taux moyen du groupe NI A35 est plus élevé que celui du groupe NI VEH ($p<0,05$) et du NI A10 ($p<0,05$). A J7, les taux des groupes NI sont statistiquement similaires.

Les taux d'expression génique d'ICAM-1 dans le striatum droit des rats IR sont significativement supérieurs aux taux mesurés pour les rats NI, à J1 et à J7.

A J1, le taux moyen d'expression du groupe IR A35 ($167,6 \pm 21,47\%$) est significativement plus élevé, comparé à celui du groupe IR VEH ($240,9 \pm 22,90\%$; $p<0,05$). A J7, la différence statistique persiste entre le groupe IR VEH ($195,6 \pm 18,72\%$) et le groupe IR A35 ($479,6 \pm 92,71\%$; $p<0,05$).

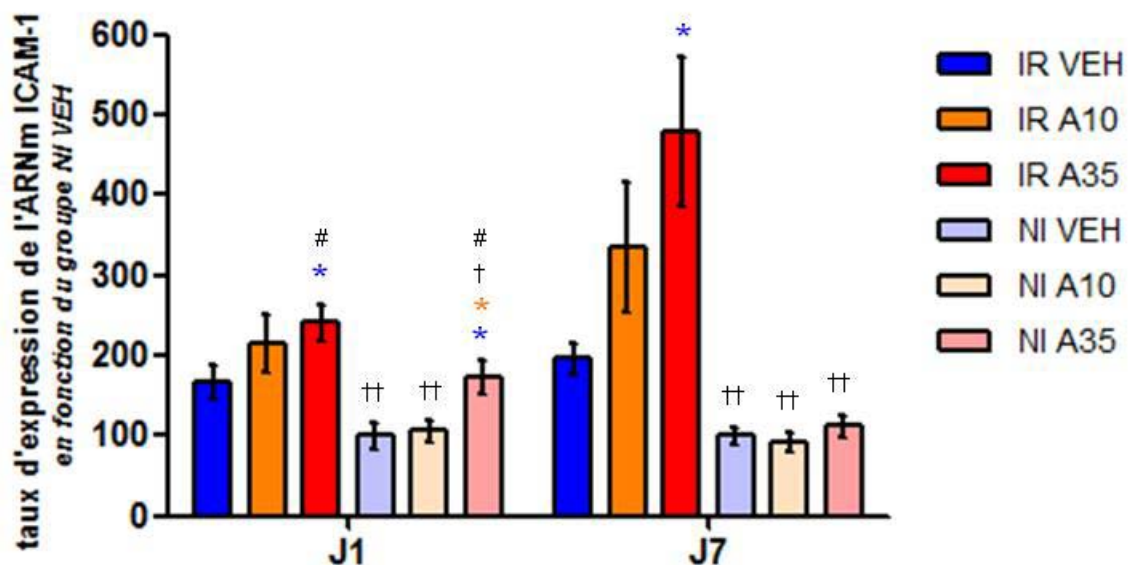


Figure 38 : Expression génique d'ICAM-1 dans le striatum droit dans les 12 groupes d'étude. * $p<0,05$ (vs le groupe IR A10 dans le protocole de cinétique correspondant). * $p<0,05$ (vs le groupe IR VEH au même temps d'étude). # $p<0,05$; (vs le même groupe correspondant à J7). † $p<0,05$; †† $p<0,01$ (vs le groupe IR du même protocole de gavage, au même temps d'étude). Effectifs à J1 : $n_{IR-VEH}=11$; $n_{IR-A10}=8$; $n_{IR-A35}=10$; $n_{NI-VEH}=7$; $n_{NI-A10}=6$; $n_{NI-A35}=5$. Effectifs à J7 : $n_{IR-VEH}=10$; $n_{IR-A10}=7$; $n_{IR-A35}=6$; $n_{NI-VEH}=5$; $n_{NI-A10}=3$; $n_{NI-A35}=6$.

Les taux d'expression génique de VCAM-1 dans le striatum droit des rats des 12 groupes d'étude sont mentionnés dans la figure 39. A J1 et à J7, les taux d'expression génique de VCAM-1 dans le striatum droit des groupes NI sont similaires (figure 42).

Les taux d'expression génique de VCAM-1 dans le striatum droit des rats IR sont significativement supérieurs aux taux mesurés pour les rats NI, à J1. Ces différences statistiques sont encore observées à J7.

A J1, le taux moyen du groupe IR A35 ($213,1 \pm 25,11\%$) est significativement plus élevé, comparé à celui du groupe IR VEH ($141,7 \pm 8,56\%$; $p < 0,01$). A J7, la différence statistique persiste entre le groupe IR VEH ($216,7 \pm 23,05\%$) et le groupe IR A35 ($367,1 \pm 60,28\%$ $p < 0,05$). Une augmentation des taux d'expression génique VCAM-1 entre J1 et J7 est notée dans le groupe IR VEH ($p < 0,05$) et le groupe IR A35 ($p < 0,05$).

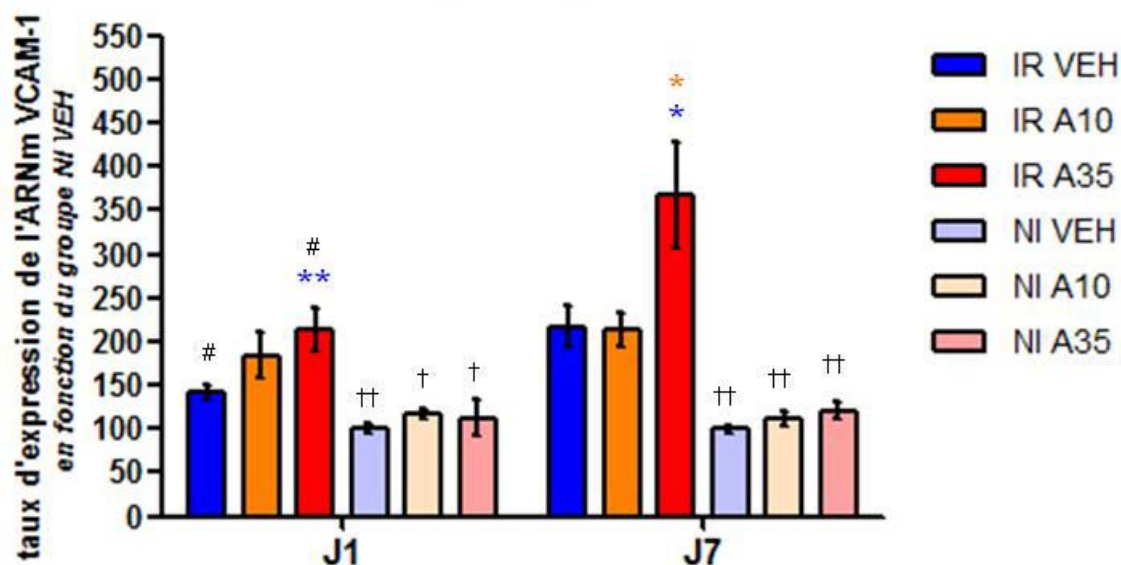


Figure 39 : Expression génique de VCAM-1 dans le striatum droit dans les 12 groupes d'étude. * $p < 0,05$ (vs le groupe IR A10 dans le protocole de cinétique correspondant). * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ (vs le groupe IR VEH au même temps d'étude). # $p < 0,05$ (vs le même groupe correspondant à J7). † $p < 0,05$; †† $p < 0,01$ (vs le groupe IR du même protocole de gavage, au même temps d'étude). Effectifs à J1 : $n_{IR-VEH}=11$; $n_{IR-A10}=8$; $n_{IR-A35}=10$; $n_{NI-VEH}=7$; $n_{NI-A10}=6$; $n_{NI-A35}=5$. Effectifs à J7 : $n_{IR-VEH}=10$; $n_{IR-A10}=7$; $n_{IR-A35}=6$; $n_{NI-VEH}=5$; $n_{NI-A10}=3$; $n_{NI-A35}=6$.

iii. Analyse de l'expression génique de ICAM-1 et de VCAM-1 dans l'hippocampe de l'hémisphère ipsilatéral

Les taux d'expression génique d'ICAM-1 dans l'hippocampe droit des rats des 12 groupes d'étude sont rapportés dans la figure 40. Les taux moyens d'expression génique d'ICAM-1 dans l'hippocampe droit des animaux des six groupes NI d'études sont similaires.

Les niveaux d'expression génique d'ICAM-1 dans l'hippocampe de l'hémisphère ipsilatéral des rats IR sont significativement supérieurs aux taux mesurés dans le cortex des rats NI à J1. Le groupe IR A35 présente un taux moyen plus élevé de $435,0 \pm 79,48\%$,

comparé au celui du groupe IR VEH $229,4 \pm 25,45\%$ ($p < 0,01$). Une diminution manifeste des taux dans l'hippocampe ipsilatéral des groupes IR est observée et approche les valeurs NI à J7.

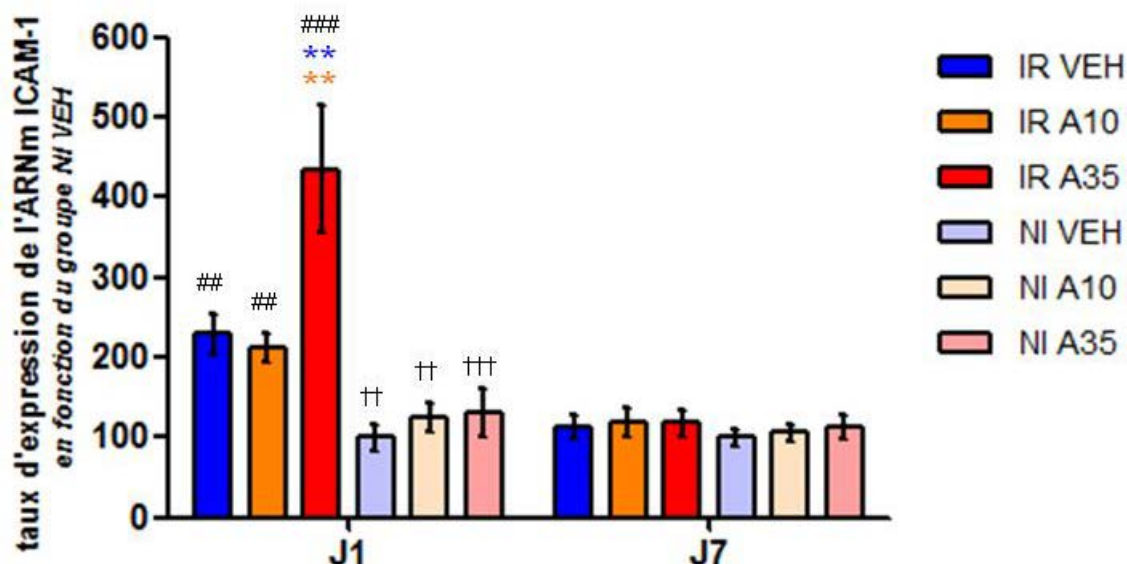


Figure 40 : Expression génique d'ICAM-1 dans l'hippocampe droit dans les 12 groupes d'étude. $**p < 0,01$ (vs le groupe IR VEH au même temps d'étude). $##p < 0,01$; $###p < 0,001$ (vs le même groupe correspondant à J7). $††p < 0,05$; $†††p < 0,001$ (vs le groupe IR du même protocole de gavage, au même temps d'étude). Effectifs à J1 : $n_{IR-VEH}=11$; $n_{IR-A10}=8$; $n_{IR-A35}=10$; $n_{NI-VEH}=7$; $n_{NI-A10}=6$; $n_{NI-A35}=5$. Effectifs à J7 : $n_{IR-VEH}=10$; $n_{IR-A10}=7$; $n_{IR-A35}=6$; $n_{NI-VEH}=5$; $n_{NI-A10}=3$; $n_{NI-A35}=6$.

Les taux d'expression génique de VCAM-1 dans l'hippocampe droit des rats des 12 groupes d'étude sont rapportés dans la figure 41. Pour l'étude des taux des groupes NI à J1 et à J7, seul celui des rats NI A35 s'élève, se distingue significativement du groupe NI VEH à J1 ($p < 0,01$) et tend à revenir à la normale à J7.

Les niveaux des taux d'expression génique de VCAM-1 des groupes IR ne se distinguent pas des taux retrouvés dans l'hippocampe des rats NI de chacun des groupes de gavages, ni à J1, ni à J7. Cependant, à J7 le taux moyen du groupe IR A35 est réduit par rapport à celui du même groupe à J1 malgré sa variabilité ($p < 0,05$).

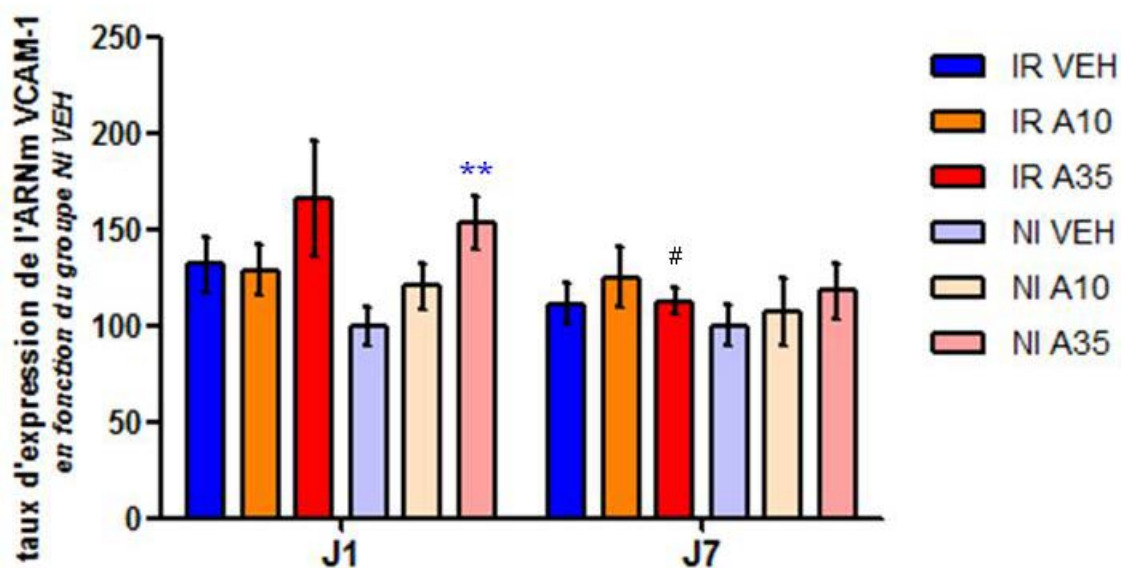


Figure 41 : Expression génique de VCAM-1 dans l'hippocampe droit dans les 12 groupes d'étude. ** $p < 0,01$ (vs le groupe IR VEH au même temps d'étude). # $p < 0,05$ (vs le même groupe correspondant à J7). Effectifs à J1 : $n_{IR-VEH}=11$; $n_{IR-A10}=8$; $n_{IR-A35}=10$; $n_{NI-VEH}=7$; $n_{NI-A10}=6$; $n_{NI-A35}=5$. Effectifs à J7 : $n_{IR-VEH}=10$; $n_{IR-A10}=7$; $n_{IR-A35}=6$; $n_{NI-VEH}=5$; $n_{NI-A10}=3$; $n_{NI-A35}=6$.

3. Infiltration des polynucléaires neutrophiles dans le foie

A. Analyse du nombre de polynucléaires neutrophiles infiltrés

À J1 et J7, le nombre de PNN caractérisés par un marquage à la MPO et infiltrés dans le foie est augmenté dans chaque groupe IR comparé au groupe NI (figure 42). Les groupes NI VEH, NI A10 et NI A35 ne présentent aucun PNN infiltré dans le foie, ni à J1, ni à J7.

À J1, le nombre de cellules positives MPO, est plus important pour le groupe de rats IR A35 ($67,15 \pm 27,20$ cellules positives), comparé à celui des rats IR VEH ($10,80 \pm 2,25$ cellules positives ; $p < 0,01$). Le nombre moyen de PNN infiltrés dans le foie des rats IR A10 est intermédiaire aux valeurs pour les deux autres groupes IR, avec $33,32 \pm 9,87$ cellules positives ($p < 0,05$ vs IR VEH ; $p = 0,16$ vs IR A35).

À J7, les nombres moyens de PNN infiltrés diminuent drastiquement dans chacun des groupes de gavages par rapport aux valeurs à J1 : $2,46 \pm 0,42$ cellules positives MPO pour le groupe IR VEH ($p < 0,001$ vs J1), $2,95 \pm 0,37$ cellules positives pour le groupe IR A10 ($p < 0,001$ vs J1), $5,98 \pm 1,15$ cellules pour le groupe IR A35 ($p < 0,001$ vs J1). Cependant, malgré ces valeurs très faibles, le nombre moyen de PNN infiltrés dans le foie se distinguent de celui du groupe IR VEH ($p < 0,01$) et de celui du groupe IR A10 ($p < 0,01$).

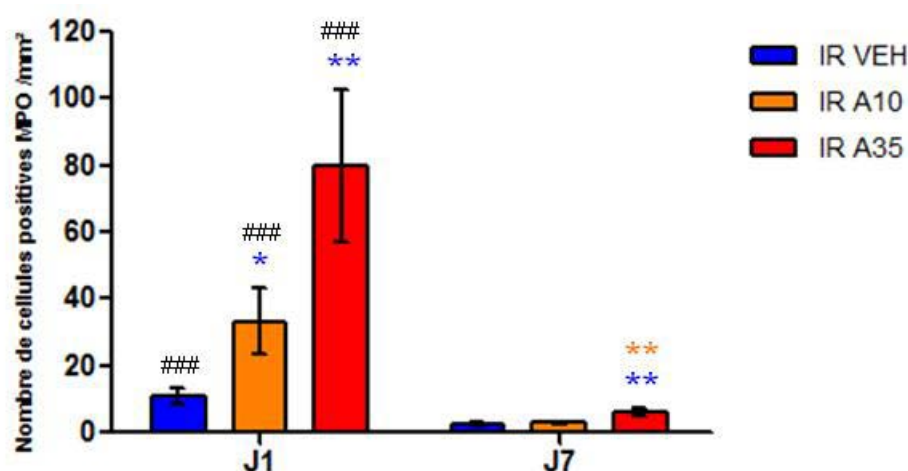


Figure 42 : Infiltration des polynucléaires neutrophiles dans le foie dans les six groupes IR d'étude. ** $p < 0,01$ (vs le groupe IR A10 dans le protocole de cinétique correspondant). * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ (vs le groupe IR VEH dans le protocole de cinétique correspondant). ### $p < 0,001$ (vs le même groupe correspondant à J7). Effectifs à J1 : $n_{IR-VEH}=11$; $n_{IR-A10}=10$; $n_{IR-A35}=7$. Effectifs à J7 : $n_{IR-VEH}=8$; $n_{IR-A10}=10$; $n_{IR-A35}=8$.

B. Analyse de l'expression génique des protéines d'adhésion leucocytaire dans le foie : ICAM-1 et VCAM-1

L'analyse de l'expression génique d'ICAM-1 dans le foie à J1 et à J7 est représentée dans la figure 43.

A J1, le taux moyen d'expression génique d'ICAM-1 dans le foie du groupe NI A35 ($181,2 \pm 28,46\%$) diffère avec les taux des groupe NI A10 ($110,3 \pm 20,74\%$; $p < 0,05$) et le groupe NI VEH ($100,0 \pm 19,49\%$; $p < 0,05$). A J7, les taux moyens des groupes NI sont statistiquement similaires : $100,0 \pm 16,14\%$ pour le groupe NI VEH, $122,9 \pm 43,69\%$ pour le groupe NI A10 et, $130,0 \pm 16,71\%$ pour le groupe NI A35. Le niveau moyen d'expression génique d'ICAM-1 dans le foie du groupe NI A35 a tendance à diminuer à J7, comparativement au niveau mesuré à J1.

Les taux d'expression génique d'ICAM-1 dans le foie des rats IR sont significativement supérieurs aux taux mesurés pour les rats NI, à J1 : $185,1 \pm 14,00\%$ pour le groupe IR VEH ($p < 0,01$), $256,3 \pm 36,77\%$ pour le groupe IR A10 ($p < 0,01$) et, $264,5 \pm 25,29\%$ pour le groupe IR A35 ($p < 0,05$). Ces différences statistiques sont encore observées à J7 : $190,0 \pm 22,42\%$ pour le groupe IR VEH ($p < 0,01$), $228,2 \pm 43,69\%$ pour le groupe IR A10 ($p < 0,01$) et, $207,4 \pm 14,87\%$ pour le groupe IR A35 ($p < 0,01$).

A J1, les taux moyens du groupe IR A35 et du groupe A10 sont significativement plus élevés, comparés à celui du groupe IR VEH ($p<0,05$). A J7, les 3 groupes IR ont des niveaux d'expression génique ICAM-1 similaires.

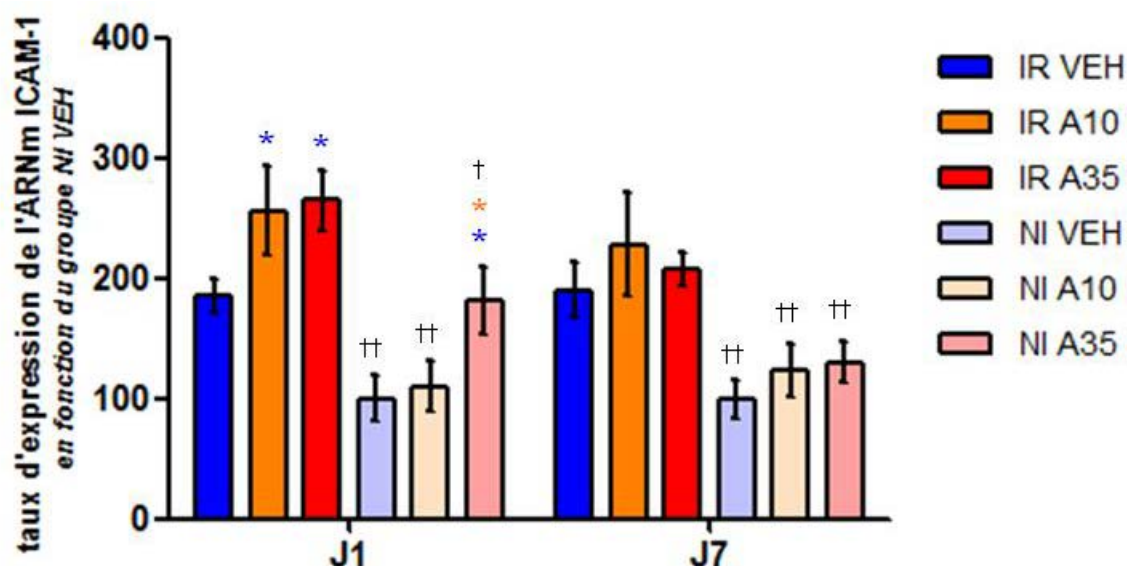


Figure 43 : Expression génique d'ICAM-1 dans le foie dans les 12 groupes d'étude. * $p<0,05$ (vs le groupe IR A10 dans le protocole de cinétique correspondant). * $p<0,05$ (vs le groupe IR VEH au même temps d'étude). † $p<0,05$; †† $p<0,01$; (vs le groupe IR du même protocole de gavage, au même temps d'étude). Effectifs à J1 : $n_{IR-VEH}=11$; $n_{IR-A10}=8$; $n_{IR-A35}=10$; $n_{NI-VEH}=7$; $n_{NI-A10}=6$; $n_{NI-A35}=5$. Effectifs à J7 : $n_{IR-VEH}=10$; $n_{IR-A10}=7$; $n_{IR-A35}=6$; $n_{NI-VEH}=5$; $n_{NI-A10}=3$; $n_{NI-A35}=6$.

L'analyse de l'expression génique de VCAM-1 dans le foie à J1 et à J7 est représentée dans la figure 44.

A J1, le taux moyen d'expression génique de VCAM-1 dans le foie diffère significativement entre le groupe NI A35 ($163,3 \pm 25,16\%$) et le groupe NI VEH ($100,0 \pm 7,58\%$; $p<0,05$). A J7, les taux des groupes NI sont statistiquement similaires : $100,0 \pm 7,94\%$ pour le groupe NI VEH, $112,0 \pm 13,82\%$ pour le groupe NI A10 et, $133,8 \pm 13,67\%$ pour le groupe NI A35 ($p<0,05$ vs NI A35 à J1). Les niveaux moyens d'expression génique de VCAM-1 dans les trois groupes IR sont sensiblement plus élevés par rapport à ceux des groupes NI de gavages respectifs, de manière statistique pour le groupe de gavage VEH uniquement ($p<0,05$).

A J1, le taux moyen du groupe IR A35 ($135,0 \pm 11,02\%$) est significativement plus élevé, comparé à celui du groupe IR VEH ($183,1 \pm 13,89\%$; $p<0,05$). A J7, la différence statistique persiste entre le groupe IR VEH ($107,9 \pm 8,26\%$) et le groupe IR A35 ($175,7 \pm 25,27$; $p<0,01$).

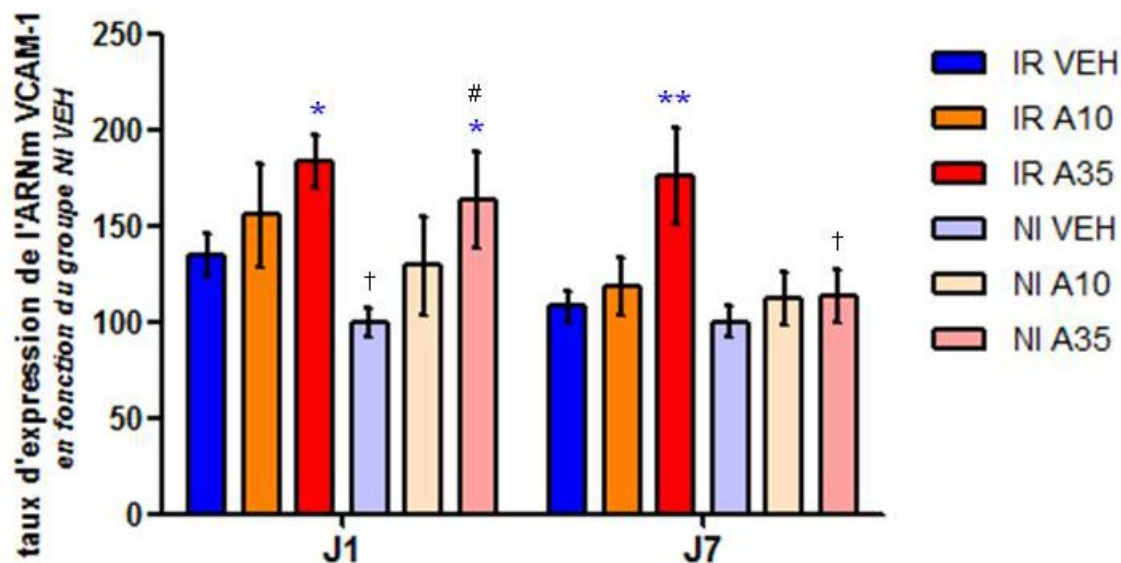


Figure 44 : Expression génique de VCAM-1 dans le foie dans les 12 groupes d'étude. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ (vs le groupe IR VEH au même temps d'étude). # $p < 0,05$ (vs le même groupe correspondant à J7). † $p < 0,05$ (vs le groupe IR du même protocole de gavage, au même temps d'étude). Effectifs à J1 : $n_{IR-VEH}=11$; $n_{IR-A10}=8$; $n_{IR-A35}=10$; $n_{NI-VEH}=7$; $n_{NI-A10}=6$; $n_{NI-A35}=5$. Effectifs à J7 : $n_{IR-VEH}=10$; $n_{IR-A10}=7$; $n_{IR-A35}=6$; $n_{NI-VEH}=5$; $n_{NI-A10}=3$; $n_{NI-A35}=6$.

V. Etude clinique

1. Comparaison des dosages des CDT entre les consommateurs excessifs et les non-consommateurs excessifs

Le dosage des CDT n'a pu être réalisé, pour des raisons techniques, sur 27 des 435 patients *Biostroke* (6,2%). Sur les 408 patients *Biostroke* auxquels le pourcentage des CDT a été calculé, 351 se situent en-dessous du seuil des 2,1%, 30 entre 2,1% et 2,5% et 27 au-dessus de 2,5%. La proportion des patients bien classés, consommateurs excessifs ou non-consommateurs excessifs avec des dosages des CDT concordants, est de 86,51% (327/378). Quand les patients, présentant une valeur située entre 2,1 et 2,5%, sont classés parmi les consommateurs excessifs, la proportion descend à 82,35% (336/408). Les 13,46% de patients mal classés sont composés de : 9,00% (34/378) de patients considérés comme consommateurs excessifs avec des dosages des CDT < 2,1% et, 4,50% (17/378) de patients non-consommateurs excessifs avec des dosages des CDT > 2,5%.

2. Comparaison des caractéristiques de base entre les consommateurs excessifs et les non-consommateurs excessifs

La comparaison des caractéristiques démographiques, les antécédents médicaux, les caractéristiques de base et les causes présumées de l'AVC ischémique entre les

consommateurs excessifs et les non-consommateurs excessifs sont exposées dans le tableau 11. Les consommateurs excessifs sont significativement plus jeunes, plus souvent de sexe masculin, fumeurs, et ont une plus haute pression artérielle diastolique et moins d'antécédents d'arythmie. Ils avaient, de manière significative, des taux plus élevés de triglycérides, de glucose, d'hémoglobine et de HDL, des volumes globulaires moyens plus élevés, des taux plus élevés de TGO et de TGP et des pourcentages plus élevés de CDT. Ils avaient également des taux plus faibles d'*interferon gamma-induced protein-10* (IP-10), de MCP-1, de VCAM, de SRAGE et d'IL-12p70.

3. Influence de la consommation excessive et chronique d'éthanol sur la sévérité initiale de l'ischémie cérébrale dans *Biostroke*

La comparaison entre les patients *Biostroke* avec un AVC mineur et sévère est détaillée dans le tableau 12. Les régressions logistiques binaires, intégrant les facteurs éligibles et un à un les marqueurs inflammatoires, sont répertoriées dans le tableau 13. Dans le premier modèle statistique de régression logistique binaire, les facteurs indépendamment associés avec une sévérité mineure de l'AVC ischémique sont un délai d'inclusion plus long, un taux sérique inférieur de glucose, un taux plus élevé d'hémoglobine, un nombre de PNN réduit, et être classé en tant que non-consommateur excessif. Les huit autres modèles statistiques intégrant indépendamment IL-6, IL-8, IL-10, IL-12p40, TGF- α , GCSF, VCAM ou MPO n'expliquent la variable dépendante NIHSS 0-5. Ne pas avoir d'antécédents d'insuffisance cardiaque, avoir un délai d'inclusion plus long, avoir des taux élevés d'hémoglobine, avoir une glycémie plus basse et une température corporelle plus élevée sont associés à un AVC mineur. Avoir de l'hypercholestérolémie est associé à un AVC mineur dans les modèles statistiques 3, 4, 6, 7, 8 et 9.

4. Implication des polynucléaires neutrophiles, et des protéines d'adhésion leucocytaires, dans l'influence de consommation excessive et chronique d'éthanol sur la sévérité de l'ischémie cérébrale

Afin d'approcher l'implication des PNN et des protéines d'adhésion (ICAM et VCAM) dans l'impact de la consommation excessive et chronique d'éthanol sur la sévérité de l'ischémie cérébrale, des tableaux croisés permettant la comparaison des taux moyens des trois marqueurs, ont été réalisés et figurent dans le tableau 14, 15 et 16.

Nous avons montré que le taux médian de PNN est augmenté significativement chez les patients ayant un AVC sévère (NIHSS \geq 6), qu'ils aient eu une consommation excessive d'éthanol ou non ($p < 0,001$ pour les deux comparaisons). Le fait d'être consommateur

excessif n'induit pas d'augmentation des taux plasmatiques des PNN comparés aux taux des patients non consommateurs excessifs, quand l'AVC est sévère.

Les taux plasmatiques d'ICAM ou de VCAM ne diffèrent pas dans les quatre conditions (respectivement tableau 15 et tableau 16). Les taux d'ICAM ou de VCAM ne varient pas significativement avec la sévérité dans les deux sous ensembles de patients consommateurs excessifs ou non. Le fait d'être consommateur excessif n'induit pas d'augmentation des taux plasmatiques d'une des deux protéines d'adhésion étudiées, quand l'AVC est sévère.

5. Implication de la cytolysé hépatique dans l'influence de la consommation excessive et chronique d'éthanol sur la sévérité de l'ischémie cérébrale

La description des résultats concernant l'implication des transaminases (TGO et TGP), marqueurs de la cytolysé hépatique, dans l'impact de la consommation excessive et chronique d'éthanol sur la sévérité de l'ischémie cérébrale, est abordée dans les tableaux croisés 17 et 18.

Dans l'analyse du sous groupe de patients non-consommateurs, le taux médian de TGO chez les patients ayant eu un AVC sévère est significativement plus élevé que celui des patients ayant eu un AVC mineur ($p=0,001$; tableau 17). Ce constat n'est pas observé chez les patients consommateurs. Les taux de TGO des patients consommateurs excessifs et ayant un AVC mineur sont significativement supérieurs aux taux des non consommateurs excessifs ($p=0,016$).

Les taux de TGP ne varient pas en fonction de la sévérité dans les 2 groupes de patients ayant une consommation excessive d'éthanol ou non (tableau 18). Par contre, les taux sont significativement plus élevés chez les patients consommateurs excessifs dans les deux sous groupes dichotomisés en fonction du NIHSS ($p=0,004$ dans le sous groupe NIHSS 0-5 ; $p=0,015$ dans le sous groupe NIHSS 6 et plus).

Tableau 11. Comparaison des caractéristiques de bases entre les consommateurs excessifs d'éthanol et les non-consommateurs ayant une ischémie cérébrale. Les données fournies sont le nombre de patients (%) si non spécifié. *médianes (rang interquartile). AVC: accident vasculaire cérébral, AIT: accident ischémique transitoire, CDT: carbohydre-deficient transferring, GRO: growth regulated oncogene, ICAM: intercellular cell adhesion molecule, IFN: interferon, IL: interleukine, IP: IFN gamma-induced protein, IQCODE: informant questionnaire on cognitive in the elderly, NIHSS: national institutes of health stroke scale, MPO: myeloperoxidase, TGF: transforming growth factor, TNF: tumor necrosis factor, MCP: monocyte chemoattractant protein, MIP: macrophage inflammatory protein, MMP: matrix metalloproteinase, PNN: polynucléaires neutrophiles, RANTES: regulated on activation normal T cell expressed and secreted, SNCAM: soluble neural cell adhesion molecule, SRAGE: soluble receptor for advanced glycation end products, TGO: glutamoxaloacétate transférase, TGP: glutamopyruvate transférase; TNF: tumor necrosis factor, VCAM: vascular cell adhesion.

	Non consommateurs excessifs n = 375	Consommateurs excessifs n = 60	Valeur p
Caractéristiques démographiques			
Age, année*	72 (60-80)	59 (53-67)	<u><0,001</u>
Sexe féminin	200 (53,3)	4 (6,7)	<u><0,001</u>
Antécédents médicaux			
Antécédent d'AVC	43 (11,5)	6 (10,0)	0,739
Antécédent d'AIT	32 (8,5)	8 (13,3)	0,232
Maladie coronaire	79 (21,1)	10 (16,7)	0,433
Insuffisance cardiaque	41 (10,9)	3 (5,0)	0,157
Arythmie	96 (25,7)	8 (13,3)	<u>0,038</u>
AVC familial	89 (23,7)	14 (23,3)	0,946
Facteurs de risques vasculaires			
Hypertension artérielle	238 (63,5)	35 (58,3)	0,445
Diabètes	71 (18,9)	13 (21,7)	0,618
Hypercholestérolémie	183 (48,8)	24 (40,0)	0,205
Hypertriglycéridémie	51 (13,6)	16 (26,7)	<u>0,009</u>
Fumeur	89 (23,7)	42 (70,0)	<u><0,001</u>
Activité physique	191 (51,5)	36 (60,0)	0,220
Fibrate+statine	151 (40,3)	15 (25,0)	<u>0,024</u>

Anti-coagulant	31 (8,3)	0 (0,0)	<u>0,013</u>
Agents anti-plaquettaires	141 (37,6)	17 (28,3)	<u>0,166</u>
Caractéristiques cliniques à l'admission			
NIHSS*	5,00 (1,00-12,00)	5,00 (2,00-12,00)	0,548
Délai d'inclusion, minutes*	1,020 (180-1, 680)	1,350 (275-2,025)	0,205
IQCODE*	78 (78-81)	78 (78-81)	0,886
Glasgow*	15 (15-15)	15 (15-15)	0,715
Index de masse corporelle*	26,10 (22,86-29,30)	27,47 (24,22-31,48)	<u>0,026</u>
Température, °C*	36,6 (36,2-37,0)	36,7 (36,3-37,0)	0,754
Pression artérielle systolique, mm Hg*	150 (134-170)	158 (146-169)	0,240
Pression artérielle diastolique, mm Hg*	80 (75-93)	90 (75-100)	<u>0,017</u>
Caractéristiques biologiques à l'admission			
Créatinine, g/L *	8,80 (7,00-10,00)	8,00 (7,00-10,08)	0,445
Glycémie, g/L *	1,00 (0,88-1,19)	1,09 (0,90-1,40)	<u>0,047</u>
Triglycérides	1,05 (0,82-1,49)	1,50 (0,87-2,31)	<u><0,001</u>
Fibrinogène	3,30 (2,80-4,00)	3,4 (2,9-3,9)	0,911
Cholestérol total, g/L *	1,87 (1,63-2,27)	1,99 (1,66-2,31)	0,426
Cholestérol HDL, g/L *	0,51 (0,43-0,64)	0,47 (0,38-0,54)	<u>0,020</u>
Cholestérol LDL, g/L *	1,10 (0,88-1,43)	1,23 (0,88-1,43)	0,619
Volume globulaire moyen	89,00 (86,00-92,00)	92,00 (90,00-96,00)	<u><0,001</u>
TGO, g/L *	22,00 (19,00-27,00)	25,00 (20,00-35,00)	<u>0,005</u>
TGP, g/L *	19,00 (15,00-26,00)	25,00 (18,00-37,00)	<u><0,001</u>
CDT (%) *	1,60 (1,50-1,80)	1,80 (1,55-2,25)	<u>0,001</u>
Hémoglobine, g/L *	13,60 (12,70-14,70)	14,30 (13,30-15,17)	<u>0,003</u>
PNN, /mm ³ *	5,30 (3,90-7,00)	5,40 (4,40-6,87)	0,600
IL-1, µg/mL *	0,0 (0,0-4,5)	0,0 (0,0-3,7)	0,751
IL-1β, µg/mL *	0,0 (0,0-1,3)	0,0 (0,0-0,6)	0,129
IL-5, µg/mL *	1,2 (0,6-2,1)	1,1 (0,6-1,6)	0,497
IL-6, µg/mL *	1,2 (0,0-5,2)	0,4 (0,0-2,9)	0,095
IL-8, µg/mL *	4,4 (2,1-7,9)	2,4 (4,3-7,5)	0,510
IL-10, µg/mL *	3,2 (0,0-8,5)	1,8 (0,0-7,5)	0,073
IL-12p40, µg/mL *	6,0 (0,0-26,175)	1,1 (0,0-16,5)	0,095
IL-13, µg/mL *	0,0 (0,0-1,0)	0,0 (0,0-0,9)	0,271
IL-17a, µg/mL *	1,20 (0,0-4,80)	0,9 (0,0-4,4)	0,647
IFN-γ, µg/mL *	7,0 (3,5-13,4)	7,3 (3,3-11,5)	0,510

TNF, µg/mL *	5,2 (2,7-7,7)	4,3 (2,4-7,5)	0,159
IP-10, µg/mL *	355,4 (219,5-523,10)	257,1 (176,6-388,3)	<u>0,001</u>
MIP-1, µg/mL *	1,2 (0,0-4,5)	1,1 (0,0-3,4)	0,496
GCSF, µg/mL *	64,1 (46,7-86,9)	57,2 (42,1-89,1)	0,254
GMCSF, µg/mL *	10,7 (5,2-22,4)	9,9 (5,3-18,6)	0,275
TGF-α, µg/mL *	1,4 (0,4-2,8)	1,1 (0,2-2,3)	0,111
MCP-1, µg/mL *	168,2 (131,0-220,45)	147,7 (120,5-196,9)	<u>0,047</u>
GRO, µg/mL *	325,7 (217,3-420,8)	284,4 (181,0-392,1)	0,170
RANTES, µg/mL *	35,76 (19,71-54,26)	31,6 (18,6-57,7)	0,569
ICAM, µg/mL *	87,76 (60,90-117,40)	90,9 (64,3-140,9)	0,268
SNCAM, µg/mL *	359,43 (297,67-448,70)	345,8 (265,9-408,2)	0,110
VCAM, µg/mL *	1368,0 (1068,4-1714,6)	1252,3 (990,1-1532,2)	<u>0,033</u>
MPO, µg/mL *	62,02 (39,87-113,12)	53,9 (36,2-87,9)	0,160
SRAGE, µg/mL *	137,9 (69,3-260,5)	82,8 (0,0-176,6)	<u>0,030</u>
IL-12p70, µg/mL *	1,6 (0,0-7,6)	1,3 (0,0-5,4)	<u>0,001</u>
MIP-1 β, µg/mL *	24,6 (17,1-35,2)	23,5 (16,3-30,4)	0,236
MMP-9, µg/mL *	114,50 (80,00-166,50)	127,00 (104,00-188,00)	0,763
Causes présumées (TOAST)			0,075
Athérosclérose	56 (14,9)	10(16,7)	
Cardioembolie	109 (29,1)	13 (21,7)	
Occlusion des petits vaisseaux	26 (6,9)	1 (1,7)	
Autres causes	23 (6,1)	2 (3,3)	
Causes non connues	161 (42,9)	34 (56,7)	
Caractéristiques cliniques suivies			
Score Rankin modifié à 3 mois 0-2	246 (65,6)	42 (70,0)	0,503

Tableau 12. Comparaison des caractéristiques de bases entre les patients avec un score national institutes of health stroke scale (NIHSS) scores 0-5 et ≥ 6 . Les données fournies sont le nombre de patients (%) si non spécifié. *médianes (rang interquartile). †valeur $p < 0,025$ pour les sous types TOAST. AVC: accident vasculaire cérébral, AIT: accident ischémique transitoire, CDT: carbohydre-deficient transferring, GRO: growth regulated oncogene, ICAM: intercellular cell adhesion molecule, IFN: interferon, IL: interleukine, IP: IFN gamma-induced protein, IQCODE: informant questionnaire on cognitive in the elderly, NIHSS: national institutes of health stroke scale, MPO: myeloperoxidase, TGF: transforming growth factor, TNF: tumor necrosis factor, MCP: monocyte chemoattractant protein, MIP: macrophage inflammatory protein, MMP: matrix metalloproteinase, PNN: polynucléaires neutrophiles, RANTES: regulated on activation normal T cell expressed and secreted, SNCAM: soluble neural cell adhesion molecule, SRAGE: soluble receptor for advanced glycation end products, TGO: glutamoxaloacétate transférase, TGP: glutamopyruvate transférase; TNF: tumor necrosis factor, VCAM: vascular cell adhesion molecule.

	NIHSS ≥ 6 n = 219	NIHSS 0 à 5 n = 216	Valeur p
Caractéristiques démographiques			
Age, année*	71 (58-79)	67 (57-78)	0,231
Sexe féminin	119 (54,3)	85 (39,4)	<u>0,002</u>
Antécédents médicaux			
Antécédent d'AVC	29 (13,2)	20 (9,3)	0,189
Antécédent d'AIT	15 (6,8)	25 (11,6)	0,088
Maladie coronaire	52 (23,7)	37 (17,1)	0,087
Insuffisance cardiaque	32 (14,6)	12 (5,6)	<u>0,002</u>
Arythmie	64 (29,4)	40 (18,5)	<u>0,008</u>
AVC familial	66 (30,1)	37 (17,1)	<u>0,001</u>
Facteurs de risques vasculaires			
Hypertension artérielle	133 (60,7)	140 (64,8)	0,378
Diabètes	45 (20,5)	39 (18,1)	0,510
Hypercholestérolémie	97 (44,3)	110 (50,9)	0,166
Hypertriglycéridémie	25 (11,4)	42 (19,4)	<u>0,020</u>
Fumeur	65 (29,7)	66 (30,6)	0,842
Consommateur excessif d'éthanol	33 (15,1)	27 (12,5)	0,437
Activité physique	103 (47,2)	124 (58,2)	<u>0,023</u>
Fibrate+statine	84 (38,4)	82 (38,0)	0,933
Anti-coagulant	17 (7,8)	14 (6,5)	0,604
Agents anti-plaquettaires	86 (39,3)	72 (33,3)	0,198
Caractéristiques cliniques d'admission			
Délai d'inclusion, minutes*	0,250 (145-1,365)	1,440 (960-2,025)	<u><0,001</u>

IQCODE*	78 (78-81)	78 (78-81)	<u>0,028</u>
Glasgow*	15 (13-15)	15 (15-15)	<u><0,001</u>
Index de masse corporelle*	26,34 (22,84-29,39)	26,40 (23,35-29,11)	0,938
Température, °C*	36,5 (36,1-37,0)	36,7 (36,4-37,0)	<u>0,020</u>
Pression artérielle systolique, mm Hg*	150 (136-170)	153 (134-168)	0,811
Pression artérielle diastolique, mm Hg*	80 (74-94)	84 (75-97)	0,281
Caractéristiques biologiques à l'admission			
Créatinine, g/L *	8,0 (7,0-10,0)	9,0 (8,0-10,5)	0,445
Glycémie, g/L *	1,09 (0,94-1,29)	0,93 (0,84-1,04)	<u><0,001</u>
Triglycérides, g/L *	1,03 (0,81-1,48)	1,14 (0,85-1,65)	0,058
Fibrinogène, g/L *	3,4 (2,7-4,2)	3,4 (2,8-3,9)	0,601
Cholestérol total, g/L *	1,88 (1,63-2,24)	1,91 (1,64-2,30)	0,373
Cholestérol HDL, g/L *	0,51 (0,44-0,62)	0,51 (0,40-0,64)	0,838
Cholestérol LDL, g/L *	1,15 (0,88-1,39)	1,10 (0,88-1,48)	0,879
TGO, g/L *	24,00 (19,00-23,00)	22,00 (18,00-25,00)	<u><0,001</u>
TGP, g/L *	20,00 (15,00-29,00)	19,00 (15,00-26,00)	<u><0,001</u>
Hémoglobine, g/L *	13,50 (13,30-14,70)	14,00 (13,00-14,80)	<u>0,002</u>
PNN, /mm ³ *	6,40 (5,10-8,50)	4,40 (3,30-5,50)	<u><0,001</u>
IL-1, µg/mL *	0,0 (0,0-4,5)	0,0 (0,0-4,5)	0,580
IL-1β, µg/mL *	0,0 (0,0-1,3)	0,0 (0,0-1,5)	0,639
IL-5, µg/mL *	1,2 (0,5-1,9)	1,1 (0,6-2,0)	0,761
IL-6, µg/mL *	2,8 (0,0-6,7)	0,0 (0,0-2,9)	<u><0,001</u>
IL-8, µg/mL *	2,5 (4,9-9,5)	3,8 (1,8-6,2)	<u><0,001</u>
IL-10, µg/mL *	0,7 (3,9-10,4)	2,1 (0,0-6,4)	<u><0,001</u>
IL-12p40, µg/mL *	7,0 (0,0-28,4)	2,7 (0,0-24,2)	0,193
IL-13, µg/mL *	0,0 (0,0-1,0)	0,0 (0,0-1,1)	0,987
IL-17a, µg/mL *	1,7 (0,0-4,6)	0,8 (0,0-4,6)	0,552
IFN-γ, µg/mL *	7,1 (3,0-12,7)	6,8 (3,9-13,9)	0,257
TNF, µg/mL *	5,2 (2,6-8,1)	4,9 (2,7-7,3)	0,513
IP-10, µg/mL *	351,0 (208,0-524,9)	330,9 (210,0-481,1)	0,684
MIP-1, µg/mL *	1,3 (0,0-4,3)	1,0 (0,0-4,4)	0,785
GCSF, µg/mL *	69,2 (47,9-91,8)	60,3 (44,0-81,2)	<u>0,018</u>
GMCSF, µg/mL *	11,6 (5,5-22,4)	9,8 (5,2-20,4)	0,424
TGF-α, µg/mL *	1,6 (0,2-2,8)	1,2 (0,4-2,6)	0,231
MCP-1, µg/mL *	166,7 (121,5-222,1)	164,8 (133,7-211,8)	0,997

GRO, µg/mL *	322,4 (226,2-418,8)	312,7 (203,1-418,4)	0,492
RANTES, µg/mL *	35,28 (19,52-57,83)	34,65 (19,51-53,77)	0,578
ICAM, µg/mL *	91,36 (54,638-123,54)	86,88 (66,07-117,22)	0,675
SNCAM, µg/mL *	360,45 (295,41-454,40)	357,50 (290,80-439,11)	0,460
VCAM, µg/mL *	1398,2 (1050,0 -1761,5)	1312,55 (1063,78-1628,25)	0,142
MPO, µg/mL *	77,13 (46,95-130,16)	50,89 (32,00-91,16)	<u>≤0,001</u>
SRAGE, µg/mL *	129,9 (60,2-299,0)	126,35 (60,88-213,30)	0,584
IL-12p70, µg/mL *	2,0 (0,0-6,7)	1,3 (0,0-7,6)	0,547
MIP-1 β, µg/mL *	25,3 (17,6-33,9)	24,0 (16,7-34,1)	0,747
MMP-9, µg/mL *	122,0 (84,3-168,8)	113,0 (82,5-166,5)	0,311
Causes présumées (TOAST)			<u>0,009</u>
Athérosclérose	38 (17,4)	28 (13,0)	†
Cardioembolie	68 (31,1)	54 (25,0)	†
Occlusion des petits vaisseaux	6 (2,7)	21 (9,7)	
Autres causes	9 (4,1)	16 (7,4)	
Causes non connues	98 (44,7)	97 (44,9)	
Caractéristiques cliniques suivies			
Score Rankin modifié 0-2	90 (41,1)	198 (91,7)	<u>≤0,001</u>

Tableau 13. Comparaison des caractéristiques de base entre les patients avec un score national institutes of health stroke scale (NIHSS) 0-5 et ≥ 6 . Les variables incluses dans chacun des modèles et non associées à un NIHSS de 0 à 5: âge, sexe féminin, antécédent d'AVC, antécédent d'AIT, arythmie, activité physique, traitement anti-plaquettaire, Informant Questionnaire on Cognitive Decline in the Elderly, sous-types cardioembolique et athérombotique. Le tableau montre les résultats des modèles de régression logistiques après l'inclusion d'un des 9 marqueurs d'inflammation éligible à l'analyse bivariable. Les valeurs sont sous forme d'odds ratios (intervalles de confiance de 95%) pour les variables indépendantes avec une valeur p significative. AdjOR>1 signifie que les patients qui ont cette variable est plus susceptible d'avoir un NIHSS de 0 à 5. Aj : ajusté, AjOR: odds ratio ajusté, Conso: consommateur, GCSF: granulocyte-colony stimulating factor, GRO: growth regulated oncogene, IL: interleukine, NIHSS: national institutes of health stroke scale, MPO: myeloperoxidase, PNN: neutrophiles polynucléaires, Rég Log: régression logistique, TGF: transforming growth factor, Val: valeur, VCAM: vascular cell adhesion molecule.

Rég Log	Val p global - R^2	Marqueur inflammatoire étudié		Conso excessif d'éthanol		Hypercholestérolémie		Insuffisance cardiaque		Délai d'inclusion, minutes		Hémoglobine, g/L		Glycémie, g/L		Température, °C	
		Val p aj	AjOR (95% IC)	Val p aj	AjOR (95% IC)	Val p aj	AjOR (95% IC)	Val p aj	AjOR (95% IC)	Val p aj	AjOR (95% IC)	Val p aj	AjOR (95% IC)	Val p aj	AjOR (95% IC)	Val p aj	AjOR (95% IC)
Modèle 1 PNN	0,027 0,487	<0,001	0,561 (0,478-0,657)	0,028	0,428 (0,201-0,912)					<0,001	2,110 (1,551-2,871)	<0,001	1,550 (1,280-1,876)	0,001	0,219 (0,084-0,535)		
Modèle 2 IL-6	0,030 0,308	0,338		0,110				0,030	0,418 (0,190-0,920)	<0,001	2,352 (1,778-3,111)	0,003	1,269 (1,084-1,485)	<0,001	0,139 (0,063-0,308)	0,031	1,565 (1,043-2,349)
Modèle 3 IL-8	0,044 0,313	0,097		0,156		0,046	1,623 (1,009-2,611)	0,020	0,388 (0,174-0,863)	<0,001	2,277 (1,723-3,009)	0,003	1,274 (1,089-1,491)	<0,001	0,116 (0,051-0,264)	0,023	1,597 (1,066-2,393)
Modèle 4 IL-10	0,044 0,313	0,187		0,156		0,046	1,623 (1,009-2,611)	0,020	0,388 (0,174-0,863)	<0,001	2,277 (1,723-3,009)	0,003	1,274 (1,089-1,491)	<0,001	0,116 (0,051-0,264)	0,023	1,597 (1,066-2,393)
Modèle 5 IL-12p40	0,024 0,303	0,448		0,126				0,025	0,406 (0,184-0,893)	<0,001	2,300 (1,742-3,036)	0,005	1,249 (1,068-1,491)	<0,001	0,134 (0,060-0,299)	0,024	1,595 (1,063-2,392)
Modèle 6 TGF- α	0,044 0,313	0,242		0,156		0,046	1,623 (1,009-2,611)	0,020	0,388 (0,174-0,863)	<0,001	2,277 (1,723-3,009)	0,003	1,274 (1,089-1,491)	<0,001	0,116 (0,051-0,264)	0,023	1,597 (1,066-2,393)
Modèle 7 GCSF	0,044 0,313	0,417		0,156		0,046	1,623 (1,009-2,611)	0,020	0,388 (0,174-0,863)	<0,001	2,277 (1,723-3,009)	0,003	1,274 (1,089-1,491)	<0,001	0,116 (0,051-0,264)	0,023	1,597 (1,066-2,393)
Modèle 8 VCAM	0,044 0,313	0,609		0,156		0,046	1,623 (1,009-2,611)	0,020	0,388 (0,174-0,863)	<0,001	2,277 (1,723-3,009)	0,003	1,274 (1,089-1,491)	<0,001	0,116 (0,051-0,264)	0,023	1,597 (1,066-2,393)
Modèle 9 MPO	0,044 0,313	0,621		0,156		0,046	1,623 (1,009-2,611)	0,020	0,388 (0,174-0,863)	<0,001	2,277 (1,723-3,009)	0,003	1,274 (1,089-1,491)	<0,001	0,116 (0,051-0,264)	0,023	1,597 (1,066-2,393)

PNN	NIHSS \geq 6	NIHSS 0-5
Non consommateurs excessifs	6,55 (5,18-8,83)	4,30 (3,30-5,45) ***
Consommateurs excessifs	6,05 (4,70-8,00)	4,80 (3,65-5,93) ***

Tableau 14 : Comparaison des taux plasmatiques de polynucléaires neutrophiles (PNN) en tableaux croisés avec les deux variables indépendantes, le score national institutes of health stroke scale (NIHSS) 0 à 5 ou 6 et plus, et consommateurs excessifs ou non-consommateurs excessifs. Les données fournies sont les valeurs médianes (rang interquartile). *** $p<0,001$ consommateurs excessifs vs non-consommateurs.

ICAM	NIHSS \geq 6	NIHSS 0-5
Non consommateurs excessifs	92,24 (53,34-120,18)	86,31 (65,83-114,10)
Consommateurs excessifs	87,11 (56,85-125,06)	102,25 (67,06-170,54)

Tableau 15 : Comparaison des taux plasmatiques de l'intercellular adhesion molecule (ICAM) en tableaux croisés avec les deux variables indépendantes, le score national institutes of health stroke scale (NIHSS) 0 à 5 ou 6 et plus, et consommateurs excessifs ou non-consommateurs excessifs. Les données fournies sont les valeurs médianes (rang interquartile).

VCAM	NIHSS \geq 6	NIHSS 0-5
Non consommateurs excessifs	1444,4 (1067,45-1813,20)	1329,60 (1067,10-1636,40)
Consommateurs excessifs	1257,1 (927,23-1563,10)	1252,10 (1006,00-1533,80)

Tableau 16 : Comparaison des taux plasmatiques de la vascular cellular adhesion molecule (VCAM) en tableaux croisés avec les deux variables indépendantes, le score national institutes of health stroke scale (NIHSS) 0 à 5 ou 6 et plus, et consommateurs excessifs ou non-consommateurs excessifs. Les données fournies sont les valeurs médianes (rang interquartile).

TGO	NIHSS \geq 6	NIHSS 0-5
Non consommateurs excessifs	24,00 (19,00-29,00)	22,00 (18,00-25,00) ^{††† *}
Consommateurs excessifs	25,50 (19,25-35,00)	24,00 (20,00-24,00)

Tableau 17 : Comparaison des taux plasmatiques de glutamoxaloacétate transférase (TGO) en tableaux croisés avec les deux variables indépendantes, le score national institutes of health stroke scale (NIHSS) 0 à 5 ou 6 et plus, et consommateurs excessifs ou non-consommateurs excessifs. Les données fournies sont les valeurs médianes (rang interquartile). ^{†††} $p < 0,001$ NIHSS \geq 6 vs NIHSS 0-5; ^{*} $p < 0,05$ consommateurs excessifs vs non-consommateurs.

TGP	NIHSS \geq 6	NIHSS 0-5
Non consommateurs excessifs	19,00 (14,00-28,00) [*]	19,00 (15,00-25,00) ^{**}
Consommateurs excessifs	26,00 (17,25-38,50)	23,00 (18,00-36,00)

Tableau 18 : Comparaison des taux plasmatiques de glutamopyruvate transférase (TGP) en tableaux croisés avec les deux variables indépendantes, le score national institutes of health stroke scale (NIHSS) 0 à 5 ou 6 et plus, et consommateurs excessifs ou non-consommateurs excessifs. Les données fournies sont les valeurs médianes (rang interquartile). ^{*} $p < 0,05$, ^{**} $p < 0,01$ consommateurs excessifs vs non-consommateurs.

Discussion

I. Résumé des résultats

Dans un premier temps, nous avons mis en évidence que la consommation excessive et chronique d'éthanol, définie par une prise de 300 g d'éthanol par semaine, était associée à des déficits neurologiques plus sévères chez les patients ayant eu une ischémie cérébrale supra-tentorielle dans les 48 heures d'inclusion dans l'étude. En parallèle, nous avons montré que les rats IR gavés quotidiennement à l'éthanol 35% v/v présentaient des volumes d'infarctus cérébral total, cortical et striatal plus sévères, des déficits neurologiques plus marqués et des troubles fonctionnels sensorimoteurs, de dextérité et de coordination motrice plus importants, à 24 heures de reperfusion, en comparaison avec les rats IR véhicules. A une semaine de reperfusion, bien que les mesures histomorphométriques des infarctus cérébraux soient significativement diminuées dans les trois groupes IR, les différences volumétriques au niveau cortical et au niveau de l'infarctus total demeurent. Les troubles fonctionnels des animaux des trois groupes IR d'études sont partiellement récupérés à une semaine de l'occlusion transitoire. D'autre part, nous avons noté une mortalité post-ischémique plus précoce, dans le groupe des rats ayant reçu une administration de doses élevées d'éthanol.

La deuxième partie de la thèse consistait en l'étude de l'impact de la consommation chronique d'éthanol sur l'inflammation post-ischémique au sein du cerveau. Nous avons montré à court terme des augmentations de l'activation microgliale et de l'infiltration des PNN, marquée par des élévations du nombre de PNN infiltrés dans le cerveau des rats IR et des taux d'expression génique des protéines d'adhésion ICAM-1 et VCAM-1 dans le cortex, le striatum de l'hémisphère ischémié. Ces phénomènes sont plus conséquents chez les rats ayant reçu un prétraitement chronique à l'éthanol 35% v/v, ce qui serait en partie expliqué par l'installation préalable d'un fond inflammatoire au niveau des parois vasculaires suite cette période d'alcoolisation. A une semaine de l'IR, le nombre de microglies activées et le nombre de PNN infiltrés variaient peu au sein des cerveaux des rats des trois groupes IR. Les niveaux d'expression génique des deux protéines d'adhésions diminuent drastiquement dans le cortex lésé, contrairement aux taux retrouvés dans le striatum, lesquels sont restés stables, voire augmentés pour le groupe de rats fortement alcoolisés. Dans la cohorte *Biostroke*, nous avons approché l'analyse de l'inflammation post-ischémique par l'étude des dosages de marqueurs inflammatoires circulants. Nous avons décrit d'une part, par une simple analyse bivariée, que les taux plasmatiques de PNN augmentent avec la sévérité chez les patients consommateurs ou non consommateurs excessifs ou tous les patients confondus. Cependant, les taux plasmatiques de PNN n'étaient pas plus élevés chez les patients consommateurs excessifs avec des déficits sévères. L'analyse bivariée des taux

d'ICAM et des taux de VCAM ne montre pas de résultats probants. D'autre part, nous avons mis en lumière dans le modèle de régression logistique qu'en plus du fait d'être consommateur excessif, le fait d'avoir un taux plus élevé de PNN dans le plasma était associé à la sévérité des déficits neurologiques sévères. Les autres marqueurs inflammatoires éligibles à l'étape préliminaires pour la sélection des variables susceptibles d'expliquer la sévérité de l'ischémie cérébrale, n'expliquent pas à eux-seuls la sévérité des déficits neurologiques.

Dans un troisième temps, nous avons étudié l'axe cerveau-foie lors d'une alcoolisation chronique et d'une ischémie cérébrale. Bien que l'état global physiologique des animaux alcoolisés soit maintenu durant les semaines d'alcoolisation, une stéatose, marquée par la coloration des gouttelettes lipidiques, et une installation d'une inflammation systémique au niveau de la paroi vasculaire étaient relevées dans le foie des rats alcoolisés à des doses élevées. Le lendemain de l'induction de l'IR, le foie était sujet à une infiltration accrue des PNN dans les trois groupes IR, caractérisée par un nombre important de PNN dans le parenchyme et une augmentation du niveau d'expression génique d'ICAM-1, laquelle est plus marquée chez les rats fortement alcoolisés. A moyen terme, le nombre de PNN infiltrés était nettement plus faible malgré le maintien des niveaux d'expression génique des deux protéines d'adhésion. D'autre part, suite à l'induction de l'ischémie cérébrale, une augmentation du taux de TGO dans le plasma est notée dans le plasma des rats alcoolisés. Si ces observations chez l'animal pourraient possiblement révéler une contribution du foie, via ces libérations de TGO, à la sévérité de l'ischémie cérébrale, la cytolysse accrue au sein du foie des consommateurs excessifs ne semble pas expliquer la sévérité importante de l'AVC induite par la prise quotidienne d'éthanol.

Les résultats précliniques et cliniques nous permettront de discuter (i) de l'impact de la consommation chronique d'éthanol sur la sévérité de l'ischémie cérébrale, (ii) de son impact sur l'immunité innée dans le cerveau, (iii) de l'axe cerveau-foie dans un contexte inflammatoire de consommation chronique d'éthanol et/ou d'ischémie cérébrale et (iv) des forces et des limites de cette étude translationnelle.

II. Impact de la consommation excessive et chronique sur la sévérité de l'ischémie cérébrale

La particularité de cette thèse réside dans la transversalité de l'étude en comparant les données d'une cohorte de patients avec celles trouvées dans un modèle expérimental chez l'animal afin de corroborer nos observations précliniques et cliniques. De plus, à notre

connaissance, l'impact de la consommation chronique et excessive d'éthanol sur la sévérité initiale de l'ischémie cérébrale n'a jamais été étudié chez l'homme. Nous avons donc effectué une analyse clinique rétrospective sur des patients ayant des ischémies cérébrales supra-tentorielles. Nous avons montré une association entre le fait d'être consommateur excessif d'éthanol et avoir des AVC sévères, ce qui est en accord avec les données de la littérature, issues des tests réalisés chez l'animal.^{227,228,230} Dans notre modèle expérimental, nous avons validé le fait que la consommation chronique d'éthanol induit des volumes totaux d'infarctus cérébraux plus conséquents en phase aiguë.^{227,228,230} Pour une analyse plus approfondie, nous avons subdivisé le volume de l'infarctus cérébral et avons montré que cette différence de volume est retrouvée aux niveaux cortical et striatal dans le groupe de rats ayant reçu des doses élevées d'éthanol quotidiennement. Ces constats reflètent la mortalité culminante retrouvée dans ce même groupe, étant donné que des AVC sévères provoquent fréquemment des décès précoces. La mortalité accrue observée dans notre modèle (40%) appuie les données de Mandybur *et al* (1983), démontrant une mortalité de 45% pour les gerbilles quotidiennement alcoolisées durant six semaines et ischémisées de manière permanente.²²⁴

L'originalité de notre étude expérimentale réside dans le fait que nous avons comparé l'influence de la consommation chronique d'éthanol à court et moyen termes. De manière intéressante, si la mortalité post-ischémique est plus élevée dans le groupe des rats alcoolisés à haute dose dans les 24 heures de reperfusion, le taux de mortalité à moyen terme est semblable à celui des deux autres groupes IR d'études. Nous montrons donc que la consommation excessive et chronique d'éthanol induit une mortalité précoce. Il est notoire que la taille de l'infarctus cérébral diminue au cours du temps par des mécanismes tardifs de neuroréparation.^{19,250} Nous avons mis en évidence que les rats traités ou non-traités à l'éthanol de notre modèle bénéficient également d'une réduction des lésions à moyen terme. Ces observations sont en cohérence avec les déficits neurologiques observés grâce à l'application du test de Bederson à court et moyen termes. La diminution de la taille de l'infarctus cérébral à une semaine de reperfusion, chez les rats contrôles ou traités, est notamment la conséquence de la résolution de l'œdème induit le lendemain de l'occlusion. Cependant, les lésions sont encore significativement plus importantes dans le groupe de rats ayant eu une administration chronique d'éthanol à haute dose. Même si l'infarctus est particulièrement volumineux à court terme dans ce groupe, celui-ci peut être modulé et diminué à moyen-terme.²⁵¹ Après une semaine de reperfusion, la différence de volume au niveau du striatum entre le groupe de rats véhicules et le groupe de rats alcoolisés à haute dose n'est plus constatée. Cela pourrait s'expliquer par la proximité du striatum lésé avec la zone sous-ventriculaire (ZSV) impliquée dans le phénomène de neurogenèse post-

ischémique. En effet, Arvidsson *et al* (2002) ont décrit la migration des cellules nouvellement formées de la ZSV vers les lésions striatales mais pas vers les lésions corticales dans un modèle animal d'OACM.²⁵⁰ La distance entre la ZSV et le cortex serait donc défavorable pour la neuroréparation des structures corticales endommagées des rats IR, comme l'a décrit Arvidsson *et al* (2002).²⁵⁰ Nous pouvons ainsi suggérer que cela est particulièrement néfaste pour les rats qui ont été journalièrement alcoolisés, puisqu'ils ont des dommages corticaux plus importants, ce qui pourrait expliquer la persistance de la différence volumétrique des lésions corticales entre les deux groupes d'animaux IR. En revanche, ces derniers bénéficient d'un régime particulièrement neuroréparateur au niveau striatal car une remise à niveau des volumes striataux est remarquée par rapport au volume striatal des rats véhicules.²⁵⁰

L'ACM irrigue la majeure partie de l'hémisphère, les régions corticales fronto-pariétales et striatales. L'atteinte de ces zones cérébrales par l'OACM entraîne donc des déficits moteurs et sensorimoteurs controlatéraux majeurs chez l'homme et dans les modèles animaux.²²⁹ Cependant, les activités quotidiennes sont en majorité tenues grâce un comportement compensatoire des déficiences. C'est pourquoi il est primordial de bien choisir les tests comportementaux afin de détecter des troubles fonctionnels de symétrie par l'intégration d'épreuves de coordination et de dextérité.²²⁹ Cela doit s'appliquer d'autant plus pour l'étude comportementale de modèles expérimentaux d'ischémie cérébrale plus complexes intégrant notamment un facteur supplémentaire, ici l'alcoolisation chronique. L'analyse de la motricité spontanée par l'actimètre ne nous a d'ailleurs pas permis de discriminer les différents groupes IR de gavages. Or les tests faisant intervenir la coordination motrice et la sensorimotricité telles que le fait de parcourir une rampe de vitesse sur un cylindre, de pouvoir rester suspendu sur une barre fixe ou de ressentir et retirer deux corps étrangers collés sur les paumes avant, ont souligné les degrés de sévérité des asymétries dans la composante motrice et la composante sensorielle.

Ces perturbations fonctionnelles ont la particularité d'être partiellement récupérées, jusqu'à atteindre des performances fonctionnelles similaires aux rats IR traités à l'eau à une semaine de reperfusion ou même aux rats NI. Même si les volumes lésionnels total et cortical sont significativement plus élevés dans le cerveau des rats fortement alcoolisés, les déficits moteurs et sensori-moteurs sont semblables aux deux autres groupes d'étude à moyen terme. Ces résultats sont intéressants puisqu'ils permettent de montrer une récupération suffisante des fonctions cérébrales et une compensation fonctionnelle dans le temps, malgré la présence des lésions plus ou moins importantes selon le protocole d'administration chronique d'éthanol.

III. Impact de la consommation chronique d'éthanol sur l'immunité innée du cerveau: rôle des polynucléaires neutrophiles et de la microglie

Dans notre cohorte de patients, l'unique marqueur inflammatoire associé à la sévérité de l'ischémie cérébrale avec la consommation excessive et chronique d'éthanol est le taux plus élevé de PNN. Les autres marqueurs biologiques inflammatoires intégrés dans le modèle statistique ne sont pas associés à la sévérité de l'ischémie cérébrale. Les cytokines et les protéines d'adhésion leucocytaires dosées dans le plasma des patients n'expliquent pas à eux-seuls la sévérité de l'AVC, cependant elles sont directement liées aux PNN. L'ensemble de ces marqueurs et leurs fonctions font partie intégrante du rôle des PNN dans les lésions ischémiques.^{24,123} C'est pourquoi le paramètre « PNN » a un poids statistique notable et majeur dans la sévérité de l'AVC, contrairement aux cytokines ou aux protéines d'adhésion étudiées indépendamment. C'est la somme de ces marqueurs qui concourent à la sévérité induite par l'afflux des PNN dans le parenchyme lésé.^{252,253} En effet, dans de nombreux modèles expérimentaux, la déplétion d'un de ces marqueurs inflammatoires conduit à des AVC mineurs. Cependant la réalité clinique est autre puisque de nombreux facteurs influencent les résultats.^{76,80,253} Nos résultats cliniques montrent donc les implications des PNN et de la consommation chronique d'éthanol dans le développement des lésions cérébrales ischémiques. Pour autant, cela ne prouve pas le lien entre les deux variables. L'étude des taux plasmatiques de PNN des patients consommateurs excessifs avec un AVC sévère ne montre pas d'augmentation, en comparaison avec les taux des patients non consommateurs. D'autre part, les dosages des protéines d'adhésion ICAM et VCAM, pour lesquelles nous avons montré une augmentation majeure au sein de l'infarctus dans notre modèle expérimental d'alcoolisation chronique suivie d'une ischémie cérébrale, ne varient pas avec la sévérité des patients. La réalisation d'un modèle animal permet de mettre en lumière la relation entre ces facteurs d'intérêt en s'affranchissant des variables susceptibles d'interagir avec la sévérité et de cibler l'échantillon tissulaire d'intérêt, le cerveau.

Pour ce faire, même si le modèle expérimental d'OACM intraluminale transitoire conduit à des ischémies cérébrales plus sévères, le phénomène de reperfusion est essentiel pour l'étude de la physiopathologie de l'ischémie cérébrale, notamment pour l'étude des cellules périphériques de l'immunité innée.⁴⁷ De plus, la période d'occlusion est modulable et permet la maîtrise de l'irrigation sanguine.

L'augmentation de l'activation microgliale et celle de l'infiltration des PNN retrouvées dans notre modèle de rats IR sont deux composantes de la réponse rapide de l'immunité

innée mises en place par l'organisme afin de pallier les dégâts causés par l'occlusion transitoire.^{24,25} La consommation excessive et chronique d'éthanol dans notre modèle expérimental OACM induit des élévations considérables du nombre de microglies activées et du nombre de PNN infiltrés dans la zone cérébrale infarctée, accompagnées d'une augmentation des taux d'expression génique d'ICAM-1 et de VCAM-1 dans le cortex et le striatum lésés à court terme. Or, nous avons montré qu'une augmentation de l'expression génique de ces deux protéines d'adhésion était naissante dans le cortex et le striatum, suite à l'administration chronique de 5 ml/kg d'une solution de 35% v/v d'éthanol, n'engendrant pas cependant la diapédèse des PNN. Dans la littérature, il n'a jamais été rapporté l'existence d'une infiltration de PNN ou une expression augmentée de protéines transmembranaires impliquées dans la diapédèse des PNN, dans le cerveau de sujets consommateurs excessifs d'éthanol ou d'animaux dans des expérimentations. *A contrario*, une activation microgliale est relevée dans un modèle murin d'alcoolisation chronique de 10 jours à des doses très élevées d'éthanol (5 g/kg par jour).²⁰¹ Nous avons noté l'inexistence de microglies activées dans le cerveau des animaux NI et alcoolisés dans notre étude. Par conséquent, bien que notre période de traitement soit quatre fois plus longue, les doses de 0,8 g/kg (A10) ou de 2,8 g/kg (A35), sont nettement inférieures à celle administrée aux souris de l'étude de Qin et Crews (2013). Les doses ne sont donc pas assez élevées pour interférer avec l'activation des cellules microgliales. Ces constats suggèrent que le cerveau est en voie de devenir inflammatoire puisque s'établit une inflammation modérée au niveau de la paroi vasculaire du cortex, du striatum et de l'hippocampe. Cependant, les initiateurs de l'immunité innée, telles que les microglies ou les neutrophiles, semblent ne pas être alertés et activés par des signaux endogènes de lésions tissulaires. Indirectement, nous pouvons suspecter que l'alcoolisation chronique que nous induisons, ne provoque pas ou peu de lésions au sein du tissu cérébral car le degré d'activation microgliale est le reflet de l'état lésionnel du cerveau.¹⁹⁵ Après la période d'alcoolisation et l'induction de l'OACM dans notre modèle, l'accroissement particulièrement remarquable du recrutement des PNN prêche à conclure que le préconditionnement inflammatoire établi lors l'alcoolisation intense, a conduit à cette élévation au moment du traumatisme. D'autre part, nous prouvons également que l'effet délétère de la consommation excessive et chronique d'éthanol sur la sévérité de l'IR, est transmis, entre autre, par l'intervention de ces deux types cellulaires de l'immunité innée, et des protéines transmembranaires aidant à la diapédèse des PNN, couramment associées à la sévérité de l'ischémie cérébrale dans diverses publications.^{24,25,33,89} A moyen terme, les rats ayant reçu une dose élevée d'éthanol dans notre modèle d'alcoolisation chronique semblent avoir une réponse microgliale et un recrutement des PNN qui s'intensifient. Ces deux phénomènes inflammatoires sont connus pour jouer un rôle précoce dans la mise en place de l'inflammation. Néanmoins, leur action a été qualifiée d'ambivalente puisque la

microglie et le neutrophile peuvent acquérir des phénotypes bénéfiques au cours du temps. Ainsi, nous pouvons émettre l'hypothèse que la diminution du volume de l'infarctus dans notre modèle peut être assimilée à l'action de la microglie de type « M2 » et l'action du neutrophile de type « N2 ». Dans le cas des rats IR et alcoolisés à haute dose, la réduction consécutive du volume striatal acquis à une semaine de reperfusion, structure dans laquelle siège une neuroplasticité active, serait probablement la somme des effets de neurorestauration induits notamment par les augmentations des PNN et des microglies activées dans le cerveau infarci. L'étude du recrutement des PNN au niveau de la paroi vasculaire à moyen terme a d'ailleurs mis en lumière une élévation des niveaux d'expression génique d'ICAM-1 et de VCAM-1 uniquement dans le striatum lésé des rats qui ont été alcoolisés journalièrement à l'éthanol 35 %v/v, ce qui suggère une infiltration des PNN ciblée au niveau striatal. Ce constat souligne l'activité inflammatoire au sein du striatum. Il reste à démontrer si celle-ci est pro- ou anti-inflammatoire. Ces notions de transformation phénotypique, sont récentes et méritent d'être approfondies dans les modèles d'alcoolisation suivie d'une IR.

IV. Axe cerveau-foie dans un contexte de consommation chronique d'éthanol et/ou d'ischémie cérébrale.

Nous avons prouvé l'existence de l'axe cerveau-foie dans un contexte de consommation chronique d'éthanol et/ou d'ischémie cérébrale. En effet, premièrement, lors de la survenue d'une ischémie cérébrale, des augmentations des PNN infiltrés dans le parenchyme hépatique et des niveaux d'expression génique d'ICAM-1 et de VCAM-1 sont mises en évidence dans le foie des rats véhicules. L'évènement ischémique cérébral a donc un impact en périphérie, étant donné que le foie sain devient inflammatoire. Dans le foie des rats alcoolisés à des doses élevées, le nombre de PNN infiltrés et leur recrutement au niveau vasculaire sont significativement majorés. L'existence d'une charge inflammatoire modérée au niveau de la paroi vasculaire hépatique des rats ayant reçu une administration excessive de solution alcoolisée a certainement contribué à l'infiltration plus importante des PNN dans ce groupe lors de l'induction de l'occlusion artérielle au niveau central. En effet, nous avons souligné des niveaux d'expression génique d'ICAM-1 et de VCAM-1 plus élevés dans le foie des rats alcoolisés à forte dose. Nos résultats pour l'étude d'ICAM-1 dans le foie des rats alcoolisés à haute dose d'éthanol sont cohérents, puisque Bautista *et al* (1997) avaient montré que l'expression d'ICAM-1 dans les hépatocytes était augmentée après un régime journalier enrichi en éthanol durant 16 semaines.¹⁷⁵ La même équipe avait montré une infiltration accrue des PNN dans le foie dans ce même modèle animal.¹⁷⁸ La durée de notre protocole d'alcoolisation chronique est quatre fois moins longue et donc moins sévère que

celle conférée par Bautista *et al.* Cela peut expliquer l'absence d'infiltration des PNN dans le parenchyme hépatique et les expressions géniques de VCAM-1 et d'ICAM-1 plus modérées. A moyen terme, l'effet de l'ischémie cérébrale sur l'état inflammatoire hépatique est largement atténué bien que l'inflammation n'ait pas cessé d'être présente au sein du cerveau. Le foie reçoit donc une décharge inflammatoire issue du phénomène aigu ischémique dans le système nerveux central, et amenée par la circulation sanguine. Nous suggérons une réponse inflammatoire secondaire du foie, sous l'influence de son état inflammatoire préexistant et de l'infiltration des PNN issus de la cascade inflammatoire ischémique. Celle-ci pourrait alors majorer les lésions cérébrales ischémiques. Le foie semble ne plus avoir de rôle à jouer à une semaine de reperfusion car les taux des deux protéines transmembranaires sont revenus à la normale.

De manière intéressante, nous avons montré un impact aigu de l'ischémie cérébrale sur les lésions hépatiques. En effet, les dosages de la TGO et de la TGP dans les groupes d'étude à court et moyen termes, mettent en évidence l'effet de l'anesthésie et un effet potentiel de l'occlusion artérielle sur la libération des transaminases dans la circulation sanguine, soit indirectement sur la lyse hépatocytaire. En effet, les rats sham de notre étude montrent des taux plus élevés que ceux retrouvés classiquement chez les rats wistar mâles élevés par Janvier labs (TGP = 93 ± 20 UI/L, TGO = 32 ± 5 UI/L). L'hydrate chloral était encore couramment utilisé au début du protocole, il était apprécié pour ses conséquences modestes sur le profil lésionnel suite à une OACM. Cependant, il est connu pour avoir des effets hépatotoxiques notamment chez les rats mâles avec une augmentation des enzymes TGO et TGP dans le sérum et avec l'apparition du foyer nécrotique lors d'une administration sub-chronique de l'hydrate chloral.²⁵⁴ Nous avons montré que l'anesthésie à 300 mg/kg d'hydrate de chloral en i.p. induit la libération de transaminases dans le sang et donc une atteinte hépatique, qui revient à la normale dans les jours précédents, au plus tard une semaine après l'anesthésie. D'autre part, l'OACM d'une heure induit une augmentation des taux de TGO dans le sang des rats alcoolisés à 24 heures de reperfusion, ce qui suggère une atteinte hépatique supérieure à celle provoquée par l'anesthésie hépatotoxique. Si l'administration d'éthanol à moyenne ou haute dose durant quatre semaines ne suffit pas pour induire une destruction majeure des cellules du foie, le protocole d'occlusion artérielle transitoire additionnée à la consommation chronique d'éthanol provoque des dommages notables au niveau du foie.

L'influence des TGO circulants sur l'ischémie cérébrale a été étudiée car cette enzyme est capable d'éliminer le glutamate. Compte tenu de l'excitotoxicité glutamatergique post-ischémique, des stratégies de neuroprotection par l'administration de TGO ont été

développées.²⁵⁵ Il a été observé une association entre les taux sanguins élevés de TGO et des bons résultats fonctionnels cliniques chez les patients ayant subi un infarctus cérébral.²⁵⁶ Dans les modèles animaux, l'administration de TGO induit une réduction de la taille de l'infarctus et des déficits sensori-moteurs par le métabolisme du glutamate dans le sang.²⁵⁶ Puisqu'il a été montré que des taux élevés de TGO dans le plasma ont eu un effet neuroprotecteur, nous pourrions donc nous attendre à une diminution de la taille de l'infarctus dans le cerveau des rats alcoolisés et ischémiés dans notre étude, ce qui n'est absolument pas le cas. D'autre part, dans notre étude clinique, les taux plasmatiques de TGO des patients ou des patients non consommateurs excessifs augmentent avec la sévérité des lésions dans l'analyse bivariable. Cependant, nos observations expérimentales montrent que les taux de transaminases reviennent à des taux normaux à une semaine de reperfusion, alors que le volume moyen de l'infarctus cérébral des rats fortement alcoolisés est encore supérieur à celui des rats véhicules. Cela suggère que la libération massive de TGO dans le sang dans notre modèle n'influence pas significativement le profil lésionnel à moyen terme. Nous ne pouvons donc pas affirmer les observations faites par Campos *et al*, ni les rejeter puisque nous sommes dans un tout autre cas de figure expérimental. A l'encontre des données cliniques de la littérature, l'hypothèse qu'un taux élevé plasmatique de TGO à court terme peut avoir un effet néfaste sur les lésions ischémiques, mériterait d'être étudiée. La sous-analyse bivariable des taux de TGO des patients consommateurs excessifs et ayant un AVC sévère ne montre pas d'augmentation significative, par rapport aux taux des patients non consommateurs. Une étude approfondie multivariable doit être réalisée en tenant compte d'autres variables explicatives indépendantes. L'impact de la consommation chronique d'éthanol sur la sévérité de l'ischémie cérébrale est menée par d'autres mécanismes néfastes, dont l'augmentation de l'excitotoxicité glutamatergique, du stress oxydant et de l'inflammation, décrite dans notre étude.^{227,230}

V. Avantages et limites

Les forces de notre étude clinique sont la grande taille de l'échantillon avec l'inclusion de 435 patients, la large gamme de score d'évaluation clinique conduisant à un meilleur pouvoir statistique et, le faible manque de valeurs. De plus, les caractéristiques générales de base des patients étaient proches de celles retrouvées chez les patients recrutés dans les centres neurovasculaires européens.²⁵⁷ La proportion de malades traités par rt-PA en i.v. est celle que nous retrouvons dans les unités neurovasculaires d'Europe.²⁵⁸ Les facteurs associés à la sévérité initiale de l'AVC autres que « consommateur excessif » sont ceux que l'on trouve dans d'autres études et qui valident ainsi notre modèle. Ces résultats suggèrent que notre population d'étude est représentative des patients ischémiés traités dans les unités

neurovasculaires et de la sorte, une bonne validité externe des résultats. La classification entre les consommateurs excessifs et les non-consommateurs excessifs était basée sur la déclaration, le critère clinique et les résultats biologiques classiques. La proportion de patients avec une bonne concordance entre le diagnostic clinique et les dosages des CDT était quasiment de 87%, ce qui est proche du pourcentage retrouvé dans la littérature (84%).²⁵⁹ Moins de 5% des non-consommateurs excessifs étaient probablement mal classés, la spécificité de CDT de la consommation chronique et excessive d'alcool étant élevée.²⁵⁹ De nombreux consommateurs excessifs déclarés avaient une valeur CDT dans la gamme normale (<2,1), il ne s'agissait pas pour autant nécessairement d'une mauvaise classification, étant donné qu'environ un tiers des patients qui consomment excessivement et habituellement de l'alcool, ne sont pas dépistés.²⁵⁹ Par conséquent, notre étude n'est pas une comparaison de groupes purement consommateurs excessifs ou non-consommateurs excessifs mais de deux groupes, l'un majoritairement constitué de consommateurs excessifs et l'autre comptant une faible proportion de consommateurs excessifs. Cependant, cet effet peut être dilué et compensé par l'ampleur de l'échantillon. Le profil des consommateurs excessifs est similaire à ce qui est reporté dans la littérature, notamment le fait d'être en moyenne plus jeune, plus souvent un homme, fumeur et avec une pression artérielle diastolique plus élevée. Le diagnostic peut ainsi être considéré comme valide. Les patients consommateurs excessifs d'éthanol dans notre cohorte présentent des taux de marqueurs inflammatoires circulants, en particulier de MCP-1 et de VCAM-1, moins élevés que les patients non consommateurs excessifs. D'autre part, les taux des cytokines classiquement retrouvées à des taux élevés dans le plasma des consommateurs tels que IL-1 β et TNF ne sont pas significativement modifiés dans le plasma des consommateurs excessifs de notre étude.^{178,209,210} Si ces résultats semblent être en discordance avec les autres investigations, le profil de nos consommateurs excessifs ne peut être assimilé au type de consommateurs examinés classiquement, puisque dans notre cohorte, aucun diagnostic approfondi du degré d'alcoolisme n'a été réalisé pour les personnes que nous considérons. En effet, les études cliniques traitant la modulation de l'immunité innée par la consommation chronique d'éthanol intègrent des personnes avec une hépatite alcoolique, paramètre dont nous n'avons pas connaissance.^{178,209,210} La force de ce constat est que nous traitons l'impact de la consommation excessive et chronique d'éthanol dans sa globalité sans exclure la plupart des consommateurs qui ne présentent pas de dysfonctionnements majeurs, soit environ 60 à 80% des cas.^{129,130} Notre étude présente également des limitations telles que le design mono-centre, le manque d'évaluation de l'occlusion artérielle pour les patients et le manque de dosages de l'alcoolémie à l'admission des patients.

L'une des forces majeures de cette étude expérimentale est la proximité de la modélisation avec ce que l'on observe chez l'homme. L'administration i.g. permet de reproduire la pharmacocinétique de l'éthanol, l'occlusion transitoire de l'ACM, de mimer la physiopathologie de l'ischémie cérébrale décrite chez l'homme. Néanmoins, la limite majeure de notre protocole d'alcoolisation chronique est l'âge des rats de l'étude. En effet, l'OACM ne peut être réalisée que sur des rats ayant un poids d'environ 300 g. Or ce poids correspond au poids d'un rat jeune adulte. Par conséquent, pour induire une consommation chronique avant l'induction de l'ischémie cérébrale, nous avons commencé l'administration i.g. chronique de solution alcoolisée chez des rats ayant entre quatre et cinq semaines d'âge, âge auquel l'animal est à peine sevré. Le protocole d'alcoolisation dure donc durant toute l'adolescence du rat. Ce paramètre ne pouvait être modifié dans notre design d'étude, et il est indéniable que le cerveau d'un rat adolescent est plus vulnérable à l'éthanol.^{187,192,260,261}

La période d'alcoolisation à moyenne ou haute dose d'éthanol n'influence pas les taux plasmatiques de TGO et de TGP. Bien que les transaminases soient des biomarqueurs couramment dosés pour déceler la consommation excessive et chronique d'éthanol chez l'homme, la détection d'élévation de ces transaminases dans les modèles animaux n'est pas systématique puisque selon l'espèce, la souche et le sexe utilisés, les réponses physiologiques sont distincts.²⁶² L'augmentation retrouvée des gouttelettes lipidiques dans le foie des rats alcoolisés quotidiennement à des moyennes et hautes doses d'éthanol fait référence au premier stade réversible de dysfonction hépatique suite à une consommation excessive et chronique d'éthanol. La stéatose hépatique et les valeurs de dosages des transaminases inchangées décrites dans notre modèle, ont également été observées dans une étude de Tirapelli *et al* (2011) utilisant également des rats wistar mâles.²⁶³ Ceci suggère que la souche de rat wistar et le sexe masculin confèrent aux sujets une résistance aux lésions hépatiques. La stéatose hépatique a la capacité de se résorber dès l'arrêt de l'intoxication éthylique mais de façon lente. C'est pourquoi elle prédomine encore dans les foies des rats moyennement et fortement alcoolisés du modèle. Des nouveaux modèles d'alcoolisation ont d'ailleurs vu le jour. A titre d'exemple, nous pouvons citer des protocoles d'alcoolisation chronique couplée avec l'administration d'une dose très élevée assimilée à du *binge-drinking*, afin d'entraîner rapidement des perturbations métaboliques et des lésions organiques chez l'animal naïf à l'éthanol.²⁶⁴ Bertola *et al* (2013) ont montré qu'il n'existait pas d'infiltration de PNN, marqués par la MPO, dans un modèle d'intoxication chronique à l'éthanol.¹⁷⁷ En revanche, l'ajout d'un gavage de 5g/kg d'éthanol huit heures avant la fin du protocole, conduisait à une infiltration des cellules positives MPO dans le foie.¹⁷⁷ Ce phénomène était accompagné d'une élévation des taux d'expression génique d'ICAM-1 et d'une diminution de VCAM-1. Dans ce même modèle, les taux de TGO et de TGP

augmentent considérablement sous l'influence de la consommation chronique d'éthanol et du *binge drinking*.¹⁷⁷

Cette étude translationnelle a l'avantage de confronter les données cliniques et pré-cliniques. La nécessité de prendre en considération les observations cliniques, telles que l'intégration de comorbidités dans l'étude des AVC, a été fondamentale et récompensée. Nous avons mis en lumière la possibilité de la réalisation de projets transversaux, en complexifiant le modèle expérimental afin de répondre aux différents profils cliniques. Les données plasmatiques des patients sont une première piste d'exploration. Cependant, l'étude aux niveaux cérébral et hépatique est difficilement faisable chez l'homme mais pourtant déterminants pour élucider les mécanismes de l'effet délétère de la consommation excessive et chronique d'éthanol sur l'ischémie cérébrale. Notre analyse expérimentale a permis d'approfondir les recherches concernant les phénomènes associés à la sévérité de l'AVC.

VI. Conclusion et perspectives

Nous avons mis en évidence l'influence de la consommation chronique d'éthanol sur la sévérité des déficits neurologiques de l'ischémie cérébrale chez l'homme et dans un modèle OACM chez le rat. Cet effet délétère est associé aux taux élevés des PNN dans le plasma des patients. L'étude préclinique a permis d'étudier de manière approfondie l'implication des PNN et celle de la microglie dans le cerveau. L'analyse histomorphométrique des volumes de l'infarctus, l'analyse immunohistochimique de deux types de cellules de l'immunité innée et les analyses biomoléculaires d'ICAM-1 et de VCAM-1 dans les différentes structures cérébrales et dans le foie ont permis d'interpréter la modulation conférée par la consommation excessive chronique d'éthanol. Notre analyse des états inflammatoires et organiques sur les rats non ischémiés et alcoolisés journallement a permis de comprendre dans quelle mesure l'importance des lésions induites est due à la présence d'un terrain déjà inflammatoire ou si la période de consommation d'éthanol agit uniquement en modulant l'immunité innée lors de l'ischémie cérébrale. L'interprétation de l'implication ou non de ces mécanismes est complexe. Si la consommation excessive d'éthanol conduit à de légères modifications de l'inflammation dans le foie et dans le cerveau avant l'infarctus, l'ischémie cérébrale provoque d'elle-même une inflammation majeure au niveau central mais aussi au niveau hépatique. Il semble que la combinaison des deux protocoles entraîne un effet délétère synergique à court terme.

De plus, ces analyses ont été menées à moyen terme, et ont montré que les rats alcoolisés fortement et ischémiés récupéraient modestement leurs capacités fonctionnelles,

jusqu'à avoir des déficits moteurs et sensori-moteurs similaires aux rats véhicules. La récupération volumétrique striatale conduit à des conclusions d'ordre neuroréparateur et nous donne des perspectives de recherche. L'élévation observée de l'expression génique des protéines d'adhésion uniquement dans le striatum des rats ayant eu une intoxication éthylique chronique et sévère, pourrait être reliée à cette diminution de volume lésionnel et, indirectement, aux phénomènes tardifs de neuroréparation post-ischémique de cette région. Compte tenu de l'augmentation de l'activation microgliale et de l'infiltration des PNN dans la zone infarctée à moyen terme, il serait intéressant d'approfondir leur rôle tardif dans la sévérité de l'ischémie cérébrale conférée par la consommation excessive et toxique d'éthanol, en utilisant des marqueurs spécifiques telles que la galectine 3 pour la microglie de type M2 et Ym1/CD206 pour le PNN de type N2. D'autre part, l'utilisation de la TEP avec un radiomarqueur des PNN ou des microglies activées permettrait d'observer leur activation et leur recrutement dans les tissus cérébral et hépatique des patients ayant eu une ischémie cérébrale afin de vérifier les données observées dans le modèle expérimental.

Le but ultime est de trouver une cible thérapeutique permettant de protéger de l'impact délétère de la consommation excessive et chronique d'éthanol sur les lésions cérébrales ischémiques. Face aux nombreux échecs thérapeutiques, il est primordial de réduire le fossé existant entre la réalité clinique et les modèles précliniques et d'ajuster les protocoles expérimentaux afin de trouver de nouvelles thérapies plus adaptées. Si nous considérons chaque sujet selon son historique médical, par exemple son statut vis-à-vis de la consommation excessive d'éthanol (représentant près de 14% des patients dans notre cohorte), un traitement approprié plus adapté au profil médical du patient pourrait être élaboré. Notre laboratoire a montré que le traitement à l'atorvastatine avait des effets bénéfiques sur la sévérité de l'ischémie cérébrale notamment en réduisant l'activation microgliale et en diminuant l'infiltration des PNN. L'application de cette thérapie dans notre modèle pourrait être intéressante afin de pallier les dommages cérébraux ischémiques. De plus, l'utilisation d'agonistes des PPAR est une piste thérapeutique à développer. Par exemple, l'activation génique de PPAR- γ permettrait la transformation phénotypique des PNN vers un phénotype bénéfique « N2 », ce qui pourrait potentialiser une neuroréparation plus efficace contre les dégâts ischémiques causés par l'alcoolisation chronique toxique.³⁹

Lors de l'introduction de cette thèse, nous avons omis de dire que l'une des plus grandes faiblesses d'Haendel était son amour pour l'alcool. Nous ignorons la nature de son AVC. Cependant, nous pouvons soupçonner qu'il ait subi un infarctus cérébral. Parce que sa consommation d'éthanol était quotidienne et excessive, la survenue de l'AVC le guettait. Celui-ci a effectivement provoqué chez lui des déficits fonctionnels sévères dont une

paralysie, l'obligeant à renoncer à son talent. Cependant, au bout de quelques mois de convalescence et de rééducation, le compositeur a pu de nouveau jouer, surpassant même ses œuvres passées. Cela est notamment la conséquence d'une neuroplasticité efficiente. Ce regain d'énergie et de santé inspirera d'ailleurs à Stefan Zweig son essai : « la résurrection de George-Frédéric Haendel ». ²⁶⁵

Annexe

Influence of chronic ethanol consumption on the neurological severity in patients with acute cerebral ischemia.

Aude Ducroquet M.Sc;¹ Didier Leys, MD, PhD;¹ Alaa Al Saabi, PharmD;² Florence Richard, MD, PhD;³ Charlotte Cordonnier, MD, PhD;¹ Marie Girot, MD, PhD;¹ Dominique Deplanque, MD, PhD;¹ Barbara Casolla, MD;¹ Delphine Allorge, PharmD, PhD;² Régis Bordet, MD, PhD.¹

Univ Lille Nord de France. EA 1046,¹ and EA 4483.² INSERM UMR 744.³ CHU Lille. F-59000 Lille, France.

Cover title: ethanol and baseline severity of cerebral ischemia

Search terms: cerebral ischemia, alcohol, stroke severity, NIHSS score.

Subject Codes: [44] Acute Cerebral Infarction

Correspondence: Didier Leys, MD, PhD. Department of neurology. Roger Salengro hospital. F-59037 Lille. France. Fax +33 320 44 60 28. E-mail: didier.leys@chru-lille.fr

Abstract

Background and purpose. We tested the hypothesis that excessive chronic ethanol consumption with more severe ischemic strokes.

Methods. We recruited patients with supratentorial cerebral ischemia within 48 hours of symptom onset. We defined heavy drinkers by a weekly consumption of 300g ethanol or more, and severe strokes by a national institutes of health stroke scale (NIHSS) score ≥ 6 .

Results. Of 436 patients, 60 were heavy-drinkers. Being a heavy drinker was independently associated with baseline NIHSS scores ≥ 6 (OR: 2.35; 95%CI: 1.12-5.26; $p=0.023$) at the logistic regression analysis. This result was not modified with the propensity analysis.

Conclusion. An excessive chronic ethanol consumption_is associated with higher baseline stroke severity.

Introduction

A chronic and excessive consumption of ethanol is associated with larger infarcts in animals.¹ To our knowledge, this effect has not been evaluated in humans. We tested the hypothesis that a chronic excessive consumption of ethanol is associated with a higher severity of the neurological deficit in acute ischemic stroke.

Method

Inclusion and non-inclusion criteria

We recruited patients with supratentorial ischemic stroke or transient ischemic attack, within 48 h of symptom onset.

Clinical assessment

Stroke severity was assessed by the National Institutes of Health Stroke Scale (NIHSS).² The cause was classified according to the TOAST criteria³. Definitions used for variables included in the analysis, have been previously defined.^{4, 5}

Imaging

All patients underwent at admission either a non-contrast computed tomographic (CT)-scan, or a magnetic resonance imaging (MRI)-scan.

Assessment of ethanol consumption.

The assessment of ethanol consumption was declarative. We considered as “heavy drinkers” patients with a weekly consumption of ethanol of 300 g or more,^{4, 5} *i.e.* 4 standard alcoholic drinks per day. When there was a discrepancy between the declaration and the biological results, we interviewed close-relatives or general practitioners. We performed a measurement of carbohydrate-deficient transferrin (CDT) serum level. These results were not used for diagnostic purposes but as validation method of the patient’s declaration. A

value between 2.1% and 2.5% was considered an area of uncertainty.⁶ CDT has a better sensitivity and specificity than corpuscular volume and gamma-glutamyl transferase for a diagnosis of excessive chronic ethanol consumption.⁶

Statistics

We performed statistics with the SPSS 15.0 package for windows. We compared patients with minor strokes (NIHSS scores 0 to 5) vs. severe strokes (NIHSS scores 6 or more), for baseline characteristics including ethanol consumption, with the Chi Square and Mann-Whitney U tests. Independent variables were selected from the univariable analysis, with a 0.25 level as a screening criterion, the variable “heavy-drinker” being forced into the model. We calculated adjusted odds ratios (_{adj}OR) and 95% confidence interval (95%CI) by logistic regression analyses, with NIHSS 6 or more as dependent variable, as in a previous study⁴. Correlations between variables were checked for collinearity, which was defined as r values > 0.6. The last step of analysis consisted of a propensity analysis. Propensity scores have been generated by a logistic regression model. Variables for the propensity score (sex, tobacco consumption, body mass index, ASAT, mean corpuscular volume and unknown cause of stroke) were included step-by-step using an alpha value of 0.15.

Ethics

The study was approved by the ethical committee, and patients or a close relative gave a signed informed consent.

Results

The study population consisted of 436 patients with a median age of 70 years (interquartile range [IQR] 58-79), 205 women (47.0%), and median NIHSS scores 6 (IQR 1-14), 105 (24.1%) treated with thrombolytic therapy, and 60 (13.8%) classified as heavy drinkers.

The comparison of heavy drinkers and non-heavy drinkers is detailed in table 1. The dosage of CDT could be performed in 409 patients (93.8%): 51 (13.5%) were misclassified, 34 were heavy drinkers with CDT <2.1% and 17 were non-heavy drinkers with CDT>2.5%.

Being classified as a heavy drinker was independently associated with more severe strokes ($_{adj}OR$ 2.26; 95%CI 1.06-4.82; $p=0.034$) (table 2). A supplementary adjustment for propensity score, found and $_{adj}OR=2.30$ ($p=0.051$).

Discussion

We have shown that being a heavy drinker was independently associated with more severe ischaemic strokes.

Factors associated with the initial severity other than ethanol consumption were those found in other studies. The limitations are the mono-center design, and the lack of evaluation of arterial occlusion and dosage of ethanolemia at baseline.

The classification between heavy and non-heavy drinkers was based on declaration, but agreement between clinical and CDT-based classification was close to 87%. As the specificity of a CDT levels >2.5% for excessive chronic ethanol consumption is high,⁷ there were probably less than 5% of heavy drinker misclassified. Many heavy drinkers had a level of CDT below 2.1%, but this is not necessarily a misclassification, as this is usually found in 1 patient of 6 with excessive chronic ethanol consumption.⁷

We found that a chronic ethanol consumption of at least 300g per week is independently associated with with a higher severity of the neurological deficit. There is not necessarily a causal relationship between ethanol consumption and stroke severity, but just a statistical association, that could be related to confounders that were not included in the analysis. Our findings generate a hypothesis that needs confirmation. As an interventional study would not be feasible, this question can be answered only through experimental approaches in animals.

Acknowledgments:

We are grateful to Anne-Marie Bordet who contributed to the data collection.

Sources of funding: this study was funded by the *Programme Hospitalier de Recherche Clinique (Biostroke, DGS 2006/0153)*.

Disclosures

The authors declare no disclosure.

References

1. Zhao H, Mayhan WG, Arrick DM, Xiong W, Sun H. Dose-related influence of chronic alcohol consumption on cerebral ischemia/reperfusion injury. *Alcohol Clin Exp Res*. 2011;35:1265-1269
2. Lyden P, Brott T, Tilley B, Welch KM, Mascha EJ, Levine S, et al. Improved reliability of the nih stroke scale using video training. Ninds tpa stroke study group. *Stroke*. 1994;25:2220-2226
3. Adams HP, Jr., Bendixen BH, Kappelle LJ, Biller J, Love BB, Gordon DL, et al. Classification of subtype of acute ischemic stroke. Definitions for use in a multicenter clinical trial. Toast. Trial of org 10172 in acute stroke treatment. *Stroke*. 1993;24:35-41
4. Deplanque D, Masse I, Lefebvre C, Libersa C, Leys D, Bordet R. Prior tia, lipid-lowering drug use, and physical activity decrease ischemic stroke severity. *Neurology*. 2006;67:1403-1410
5. Casolla B, Dequatre-Ponchelle N, Rossi C, Henon H, Leys D, Cordonnier C. Heavy alcohol intake and intracerebral hemorrhage: Characteristics and effect on outcome. *Neurology*. 2012;79:1109-1115
6. Delanghe JR, Helander A, Wielders JP, Pekelharing JM, Roth HJ, Schellenberg F, et al. Development and multicenter evaluation of the n latex cdt direct immunonephelometric assay for serum carbohydrate-deficient transferrin. *Clin Chem*. 2007;53:1115-1121
7. Reynaud M, Schellenberg F, Loiseux-Meunier MN, Schwan R, Maradeix B, Planche F, et al. Objective diagnosis of alcohol abuse: Compared values of carbohydrate-deficient transferrin (cdt), gamma-glutamyl transferase (ggt), and mean corpuscular volume (mcv). *Alcohol Clin Exp Res*. 2000;24:1414-1419

Table 1. Comparison of baseline characteristics between heavy drinkers and non-heavy drinkers. Data provided are number of patients (%) unless specified; p values calculated with Chi square test. *median (interquartile range), and Mann-Whitney U test. NIHSS: national institutes of health stroke scale.

	NON-HEAVY DRINKERS n = 376	HEAVY DRINKERS n = 60	p values
Demographic characteristics			
Age, years*	72 (60-80)	59 (53-67)	<u>0.000</u>
Women	201 (53.4)	4 (6.7)	<u>0.000</u>
Medical history			
Previous stroke	43 (11.4)	6 (10.0)	0.744
Previous transient ischemic attack	32 (8.5)	8 (13.3)	0.229
Heart failure	41 (10.9)	3 (5.0)	0.159
Coronary heart disease	21 (5.6)	5 (8.3)	0.284
Atrial fibrillation	96 (25.6)	8 (13.3)	<u>0.039</u>
Vascular risk factors			
Arterial hypertension	239 (63.6)	35 (58.3)	0.436
Diabetes mellitus	71 (18.9)	13 (21.7)	0.612
Known hypercholesterolemia	184 (48.9)	24 (40.0)	0.198
Know hypertriglyceridemia	51 (13.6)	16 (26.7)	<u>0.009</u>
Smoking	89 (23.7)	42 (70.0)	<u>0.000</u>
Clinical characteristics at admission			
National Institutes of Health stroke scale*	5.00 (1.00-14.75)	6.00 (2.00-12.00)	0.567
Delay onset-inclusion, minutes*	1,035 (180-1,680)	1,350 (275-2,025)	0.217
Temperature, °C*	36.6 (36.2-37.0)	36.7 (36.3-37.0)	0.767
Systolic blood pressure, mm Hg*	150 (134-170)	158 (146-169)	0.237
Diastolic blood pressure, mm Hg*	80 (75-94)	90 (75-100)	<u>0.018</u>
Body Mass Index*	26.1 (22.9-29.3)	27.5 (24.2-31.5)	<u>0.026</u>
Biological characteristics at admission			
Serum glucose concentration, g/L*	1.00 (0.88-1.20)	1.09 (0.90-1.40)	<u>0.049</u>
Triglycerides, g/L*	1.05 (0.82-1.48)	1.50 (0.87-2.31)	<u>0.000</u>
Total cholesterol, g/L*	1.88 (1.63-2.27)	1.99 (1.66-2.31)	0.426
High-density lipoprotein cholesterol, g/L*	0.52 (0.43-0.64)	0.47 (0.38-0.54)	<u>0.019</u>
Low-density lipoprotein cholesterol, g/L*	1.10 (0.88-1.43)	1.23 (0.88-1.43)	0.616
Fibrinogen, g/L*	3.3 (2.8-4.0)	3.4 (2.9-3.9)	0.895
Neutrophils, /mm ³ *	5300 (3825-7000)	5350 (4325-6875)	0.693
Leukocytes, /mm ³ *	7920 (6380-9750)	8360 (6925-9835)	0.241
Platelets, 1000/mm ³ *	235 (198-273)	241 (189-282)	0.896
Carbohydrate-deficient transferrin (%)*	1.60 (1.50-1.80)	1.80 (1.55-2.25)	0.001
Presumed cause of stroke (TOAST)			
Atherosclerosis	56 (14.9)	10 (16.7)	0.722
Cardioembolism	109 (29.0)	13 (21.7)	0.241
Small-vessel occlusion	26 (6.9)	1 (1.7)	0.090
Other definite	23 (6.1)	2 (3.3)	0.304
Unknown	162 (43.1)	34 (56.7)	0.050

Table 2. Comparison of baseline characteristics, between patients with national institutes of health stroke scale (NIHSS) scores 0-5 and ≥ 6 . Data provided are number of patients (%) unless specified. *median (interquartile range). AdjOR: adjusted odds ratio. CI: confidence interval. AdjOR are presented for variables independently associated with NIHSS >6 at the logistic regression analysis. AdjOR >1 means that patients who have this variable are more likely to have NIHSS >6 . Overall p value <0.001 , $r^2=0.480$, predictive value of the model =77.7%. Variables not associated with NIHSS ≥ 6 : age, sex, previous stroke, previous TIA, heart failure, atrial fibrillation, IQCODE, hypercholesterolemia, physical activity, on-going antiplatelet agents, temperature, triglyceride level, cardioembolic and atherothrombotic subtypes.

	NIHSS 0 to 5 n = 216	NIHSS ≥ 6 n = 220	AdjOR (95%CI) ‡	Adjusted p values
Heavy-drinkers	27 (12.5)	33 (15.0)	2.26 (1.06-4.82)	0.034
Delay onset-inclusion, minutes*	1,440 (960-2,025)	262 (146-1,380)	0.999 (0.999-1.000)	<0.001
Serum glucose concentration, g/L*	0.93 (0.84-1.04)	1.09 (0.94-1.30)	4.75 (1.94-11.64)	0.001
Hemoglobin, g/dL*	14.0 (13.0-14.8)	13.5 (12.6-14.7)	0.65 (0.53-0.78)	<0.001
Neutrophils, /mm ³ *	4,400 (3,300-5,500)	6,400 (4,900-8,600)	1.001 (1.000-1.001)	<0.001

Références

1. Adams, H. P. *et al.* Classification of subtype of acute ischemic stroke. Definitions for use in a multicenter clinical trial. TOAST. Trial of Org 10172 in Acute Stroke Treatment. *Stroke* **24**, 35–41 (1993).
2. WHO | The top 10 causes of death. *WHO* at <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs310/en/>
3. Muir, K. W., Buchan, A., Kummer, R. von, Rother, J. & Baron, J.-C. Imaging of acute stroke. *The Lancet Neurology* **5**, 755–768 (2006).
4. Berkhemer, O. A. *et al.* A randomized trial of intraarterial treatment for acute ischemic stroke. *N. Engl. J. Med.* **372**, 11–20 (2015).
5. Jovin, T. G. *et al.* Thrombectomy within 8 hours after symptom onset in ischemic stroke. *N. Engl. J. Med.* **372**, 2296–2306 (2015).
6. Saver, J. L. *et al.* Stent-retriever thrombectomy after intravenous t-PA vs. t-PA alone in stroke. *N. Engl. J. Med.* **372**, 2285–2295 (2015).
7. Goyal, M. *et al.* Randomized assessment of rapid endovascular treatment of ischemic stroke. *N. Engl. J. Med.* **372**, 1019–1030 (2015).
8. Campbell, B. C. V. *et al.* Endovascular therapy for ischemic stroke with perfusion-imaging selection. *N. Engl. J. Med.* **372**, 1009–1018 (2015).
9. Sardar, P. *et al.* Endovascular therapy for acute ischaemic stroke: a systematic review and meta-analysis of randomized trials. *Eur. Heart J.* **36**, 2373–2380 (2015).

10. Broderick, J. P. *et al.* Endovascular therapy after intravenous t-PA versus t-PA alone for stroke. *N. Engl. J. Med.* **368**, 893–903 (2013).
11. Ciccone, A., Valvassori, L. & SYNTHESIS Expansion Investigators. Endovascular treatment for acute ischemic stroke. *N. Engl. J. Med.* **368**, 2433–2434 (2013).
12. Kidwell, C. S., Jahan, R. & Saver, J. L. Endovascular treatment for acute ischemic stroke. *N. Engl. J. Med.* **368**, 2434–2435 (2013).
13. Brott, T. *et al.* Measurements of acute cerebral infarction: a clinical examination scale. *Stroke* **20**, 864–870 (1989).
14. Grau, A. J. *et al.* Risk factors, outcome, and treatment in subtypes of ischemic stroke: the German stroke data bank. *Stroke* **32**, 2559–2566 (2001).
15. Ankolekar, S., Rewell, S., Howells, D. W. & Bath, P. M. W. The influence of stroke risk factors and comorbidities on assessment of stroke therapies in humans and animals. *Int J Stroke* **7**, 386–397 (2012).
16. O'Donnell, M. J. *et al.* Risk factors for ischaemic and intracerebral haemorrhagic stroke in 22 countries (the INTERSTROKE study): a case-control study. *Lancet* **376**, 112–123 (2010).
17. Kim, S. H. *et al.* Factors related to the initial stroke severity of posterior circulation ischemic stroke. *Cerebrovasc. Dis.* **36**, 62–68 (2013).

18. Dirnagl, U., Iadecola, C. & Moskowitz, M. A. Pathobiology of ischaemic stroke: an integrated view. *Trends Neurosci.* **22**, 391–397 (1999).
19. Zaleska, M. M. *et al.* The development of stroke therapeutics: promising mechanisms and translational challenges. *Neuropharmacology* **56**, 329–341 (2009).
20. Jin, R., Yang, G. & Li, G. Inflammatory mechanisms in ischemic stroke: role of inflammatory cells. *J. Leukoc. Biol.* **87**, 779–789 (2010).
21. Lehmann, J. *et al.* Inflammatory cell recruitment after experimental thromboembolic stroke in rats. *Neuroscience* **279**, 139–154 (2014).
22. Smith, C. J. *et al.* The immune system in stroke: clinical challenges and their translation to experimental research. *J Neuroimmune Pharmacol* **8**, 867–887 (2013).
23. Baron, J. C. Mapping the ischaemic penumbra with PET: implications for acute stroke treatment. *Cerebrovasc. Dis.* **9**, 193–201 (1999).
24. Iadecola, C. & Anrather, J. The immunology of stroke: from mechanisms to translation. *Nat. Med.* **17**, 796–808 (2011).
25. Benakis, C., Garcia-Bonilla, L., Iadecola, C. & Anrather, J. The role of microglia and myeloid immune cells in acute cerebral ischemia. *Front Cell Neurosci* **8**, 461 (2014).
26. Chamorro, Á. *et al.* The immunology of acute stroke. *Nat Rev Neurol* **8**, 401–410 (2012).

27. Ginhoux, F., Lim, S., Hoeffel, G., Low, D. & Huber, T. Origin and differentiation of microglia. *Front Cell Neurosci* **7**, 45 (2013).
28. Legendre, P. & Le Corronc, H. [Microglial cells and development of the embryonic central nervous system]. *Med Sci (Paris)* **30**, 147–152 (2014).
29. Campanella, M., Sciorati, C., Tarozzo, G. & Beltramo, M. Flow Cytometric Analysis of Inflammatory Cells in Ischemic Rat Brain. *Stroke* **33**, 586–592 (2002).
30. Denes, A. *et al.* Proliferating resident microglia after focal cerebral ischaemia in mice. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* **27**, 1941–1953 (2007).
31. Price, C. J. S. *et al.* Intrinsic activated microglia map to the peri-infarct zone in the subacute phase of ischemic stroke. *Stroke* **37**, 1749–1753 (2006).
32. Gulyás, B. *et al.* Evolution of microglial activation in ischaemic core and peri-infarct regions after stroke: a PET study with the TSPO molecular imaging biomarker [((11)C]vinpocetine. *J. Neurol. Sci.* **320**, 110–117 (2012).
33. Taylor, R. A., Sansing, L. H., Taylor, R. A. & Sansing, L. H. Microglial Responses after Ischemic Stroke and Intracerebral Hemorrhage, Microglial Responses after Ischemic Stroke and Intracerebral Hemorrhage. *Journal of Immunology Research, Journal of Immunology Research* **2013**, **2013**, e746068 (2013).
34. Hanisch, U.-K. & Kettenmann, H. Microglia: active sensor and versatile effector cells in the normal and pathologic brain. *Nat. Neurosci.* **10**, 1387–1394 (2007).

35. Shi, J., Gilbert, G. E., Kokubo, Y. & Ohashi, T. Role of the liver in regulating numbers of circulating neutrophils. *Blood* **98**, 1226–1230 (2001).
36. Bugl, S., Wirths, S., Müller, M. R., Radsak, M. P. & Kopp, H.-G. Current insights into neutrophil homeostasis. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **1266**, 171–178 (2012).
37. Yipp, B. G. *et al.* Infection-induced NETosis is a dynamic process involving neutrophil multitasking in vivo. *Nat. Med.* **18**, 1386–1393 (2012).
38. Tsai, N.-W., Chang, W.-N., Shaw, C.-F., Jan, C.-R. & Lu, C.-H. Leucocyte apoptosis in patients with acute ischaemic stroke. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* **37**, 884–888 (2010).
39. Cuartero, M. I. *et al.* N2 neutrophils, novel players in brain inflammation after stroke: modulation by the PPAR γ agonist rosiglitazone. *Stroke* **44**, 3498–3508 (2013).
40. Ren, X. *et al.* Regulatory B cells limit CNS inflammation and neurologic deficits in murine experimental stroke. *J. Neurosci.* **31**, 8556–8563 (2011).
41. Jickling, G. C. *et al.* Targeting neutrophils in ischemic stroke: translational insights from experimental studies. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* **35**, 888–901 (2015).
42. Tang, Y. *et al.* Gene expression in blood changes rapidly in neutrophils and monocytes after ischemic stroke in humans: a microarray study. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* **26**, 1089–1102 (2006).

43. Kriz, J. Inflammation in ischemic brain injury: timing is important. *Crit Rev Neurobiol* **18**, 145–157 (2006).
44. Garcia-Bonilla, L. *et al.* Inducible nitric oxide synthase in neutrophils and endothelium contributes to ischemic brain injury in mice. *J. Immunol.* **193**, 2531–2537 (2014).
45. Price, C. J. S. *et al.* Cerebral neutrophil recruitment, histology, and outcome in acute ischemic stroke: an imaging-based study. *Stroke* **35**, 1659–1664 (2004).
46. Lo, E. H. Experimental models, neurovascular mechanisms and translational issues in stroke research. *Br. J. Pharmacol.* **153 Suppl 1**, S396–405 (2008).
47. Prestigiacomo, C. J. *et al.* CD18-mediated neutrophil recruitment contributes to the pathogenesis of reperfused but not nonreperfused stroke. *Stroke* **30**, 1110–1117 (1999).
48. Zhang, R. L. *et al.* Anti-intercellular adhesion molecule-1 antibody reduces ischemic cell damage after transient but not permanent middle cerebral artery occlusion in the Wistar rat. *Stroke* **26**, 1438–1442; discussion 1443 (1995).
49. Yenari, M. A., Xu, L., Tang, X. N., Qiao, Y. & Giffard, R. G. Microglia potentiate damage to blood-brain barrier constituents: improvement by minocycline in vivo and in vitro. *Stroke* **37**, 1087–1093 (2006).
50. Zhou, M., Wang, C. M., Yang, W.-L. & Wang, P. Microglial CD14 activated by iNOS contributes to neuroinflammation in cerebral ischemia. *Brain Res.* **1506**, 105–114 (2013).

51. Lalancette-Hébert, M., Gowing, G., Simard, A., Weng, Y. C. & Kriz, J. Selective ablation of proliferating microglial cells exacerbates ischemic injury in the brain. *J. Neurosci.* **27**, 2596–2605 (2007).
52. Gerhard, A. *et al.* In vivo imaging of activated microglia using [11C]PK11195 and positron emission tomography in patients after ischemic stroke. *Neuroreport* **11**, 2957–2960 (2000).
53. Radlinska, B. A. *et al.* Multimodal microglia imaging of fiber tracts in acute subcortical stroke. *Ann. Neurol.* **66**, 825–832 (2009).
54. Thiel, A. & Heiss, W.-D. Imaging of microglia activation in stroke. *Stroke* **42**, 507–512 (2011).
55. McCann, S. K., Dusting, G. J. & Roulston, C. L. Nox2 knockout delays infarct progression and increases vascular recovery through angiogenesis in mice following ischaemic stroke with reperfusion. *PLoS ONE* **9**, e110602 (2014).
56. McCann, S. K., Dusting, G. J. & Roulston, C. L. Early increase of Nox4 NADPH oxidase and superoxide generation following endothelin-1-induced stroke in conscious rats. *J. Neurosci. Res.* **86**, 2524–2534 (2008).
57. Thored, P. *et al.* Long-term accumulation of microglia with proneurogenic phenotype concomitant with persistent neurogenesis in adult subventricular zone after stroke. *Glia* **57**, 835–849 (2009).

58. Neumann, J. *et al.* Microglia provide neuroprotection after ischemia. *FASEB J.* **20**, 714–716 (2006).
59. Nakajima, K. & Kohsaka, S. Functional roles of microglia in the central nervous system. *Hum. Cell* **11**, 141–155 (1998).
60. Huang, W. C. *et al.* Direct protection of cultured neurons from ischemia-like injury by minocycline. *Anat Cell Biol* **43**, 325–331 (2010).
61. Yrjänheikki, J. *et al.* A tetracycline derivative, minocycline, reduces inflammation and protects against focal cerebral ischemia with a wide therapeutic window. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **96**, 13496–13500 (1999).
62. Matsukawa, N. *et al.* Therapeutic targets and limits of minocycline neuroprotection in experimental ischemic stroke. *BMC Neurosci* **10**, 126 (2009).
63. Kuang, X. *et al.* Ligustilide ameliorates neuroinflammation and brain injury in focal cerebral ischemia/reperfusion rats: involvement of inhibition of TLR4/peroxiredoxin 6 signaling. *Free Radic. Biol. Med.* **71**, 165–175 (2014).
64. Liu, K. *et al.* Anti-high mobility group box 1 monoclonal antibody ameliorates brain infarction induced by transient ischemia in rats. *FASEB J.* **21**, 3904–3916 (2007).
65. Caso, J. R. *et al.* Toll-like receptor 4 is involved in brain damage and inflammation after experimental stroke. *Circulation* **115**, 1599–1608 (2007).
66. Caso, J. R. *et al.* Toll-like receptor 4 is involved in subacute stress-induced neuroinflammation and in the worsening of experimental stroke. *Stroke* **39**, 1314–1320

(2008).

67. Brea, D. *et al.* Toll-like receptors 2 and 4 in ischemic stroke: outcome and therapeutic values. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* **31**, 1424–1431 (2011).
68. Lalancette-Hébert, M. *et al.* Galectin-3 is required for resident microglia activation and proliferation in response to ischemic injury. *J. Neurosci.* **32**, 10383–10395 (2012).
69. Buck, B. H. *et al.* Early neutrophilia is associated with volume of ischemic tissue in acute stroke. *Stroke* **39**, 355–360 (2008).
70. Akopov, S. E., Grigorian, G. S. & Ovanessian, G. A. Deactivation of NO by polymorphonuclear leukocytes in patients with ischemic cerebral infarction. *Stroke* **27**, 2337–2338 (1996).
71. Hurn, P. D. *et al.* T- and B-cell-deficient mice with experimental stroke have reduced lesion size and inflammation. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* **27**, 1798–1805 (2007).
72. Pétrault, O. *et al.* Pharmacological neutropenia prevents endothelial dysfunction but not smooth muscle functions impairment induced by middle cerebral artery occlusion. *Br. J. Pharmacol.* **144**, 1051–1058 (2005).
73. Amantea, D. *et al.* Rational modulation of the innate immune system for neuroprotection in ischemic stroke. *Front. Neurosci* **9**, 147 (2015).
74. del Zoppo, G. J., Schmid-Schönbein, G. W., Mori, E., Copeland, B. R. & Chang, C. M. Polymorphonuclear leukocytes occlude capillaries following middle cerebral artery

- occlusion and reperfusion in baboons. *Stroke* **22**, 1276–1283 (1991).
75. del Zoppo, G. J. & Mabuchi, T. Cerebral microvessel responses to focal ischemia. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* **23**, 879–894 (2003).
 76. Barone, F. C. *et al.* Tumor necrosis factor- α . A mediator of focal ischemic brain injury. *Stroke* **28**, 1233–1244 (1997).
 77. Loddick, S. A. & Rothwell, N. J. Neuroprotective effects of human recombinant interleukin-1 receptor antagonist in focal cerebral ischaemia in the rat. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* **16**, 932–940 (1996).
 78. Lambertsen, K. L., Biber, K. & Finsen, B. Inflammatory cytokines in experimental and human stroke. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* **32**, 1677–1698 (2012).
 79. Amantea, D., Nappi, G., Bernardi, G., Bagetta, G. & Corasaniti, M. T. Post-ischemic brain damage: pathophysiology and role of inflammatory mediators. *FEBS J.* **276**, 13–26 (2009).
 80. Rosell, A. *et al.* MMP-9–Positive Neutrophil Infiltration Is Associated to Blood–Brain Barrier Breakdown and Basal Lamina Type IV Collagen Degradation During Hemorrhagic Transformation After Human Ischemic. *Stroke* **39**, 1121–1126 (2008).
 81. Rothwell, N. Interleukin-1 and neuronal injury: mechanisms, modification, and therapeutic potential. *Brain Behav. Immun.* **17**, 152–157 (2003).

82. Emsley, H. C. A. *et al.* A randomised phase II study of interleukin-1 receptor antagonist in acute stroke patients. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatr.* **76**, 1366–1372 (2005).
83. Romanic, A. M., White, R. F., Arleth, A. J., Ohlstein, E. H. & Barone, F. C. Matrix metalloproteinase expression increases after cerebral focal ischemia in rats: inhibition of matrix metalloproteinase-9 reduces infarct size. *Stroke* **29**, 1020–1030 (1998).
84. Zaremba, J. & Losy, J. Early TNF-alpha levels correlate with ischaemic stroke severity. *Acta Neurol. Scand.* **104**, 288–295 (2001).
85. Rallidis, L. S. *et al.* Elevated soluble intercellular adhesion molecule-1 levels are associated with poor short-term prognosis in middle-aged patients with acute ischaemic stroke. *Int. J. Cardiol.* **132**, 216–220 (2009).
86. Selakovic, V., Raicevic, R. & Radenovic, L. Temporal patterns of soluble adhesion molecules in cerebrospinal fluid and plasma in patients with the acute brain infraction. *Dis. Markers* **26**, 65–74 (2009).
87. Fassbender, K. *et al.* Circulating selectin- and immunoglobulin-type adhesion molecules in acute ischemic stroke. *Stroke* **26**, 1361–1364 (1995).
88. Wang, J. Y. J. *et al.* Association of soluble intercellular adhesion molecule 1 with neurological deterioration of ischemic stroke: The Chongqing Stroke Study. *Cerebrovasc. Dis.* **21**, 67–73 (2006).
89. Zhang, R. L. *et al.* Anti-ICAM-1 antibody reduces ischemic cell damage after transient middle cerebral artery occlusion in the rat. *Neurology* **44**, 1747–1751 (1994).

90. Kitagawa, K. *et al.* Deficiency of intercellular adhesion molecule 1 attenuates microcirculatory disturbance and infarction size in focal cerebral ischemia. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* **18**, 1336–1345 (1998).
91. McColl, B. W., Allan, S. M. & Rothwell, N. J. Systemic infection, inflammation and acute ischemic stroke. *Neuroscience* **158**, 1049–1061 (2009).
92. Soriano, S. G. *et al.* Mice deficient in Mac-1 (CD11b/CD18) are less susceptible to cerebral ischemia/reperfusion injury. *Stroke* **30**, 134–139 (1999).
93. Yenari, M. A. *et al.* Hu23F2G, an antibody recognizing the leukocyte CD11/CD18 integrin, reduces injury in a rabbit model of transient focal cerebral ischemia. *Exp. Neurol.* **153**, 223–233 (1998).
94. Zhang, L. *et al.* Effects of a selective CD11b/CD18 antagonist and recombinant human tissue plasminogen activator treatment alone and in combination in a rat embolic model of stroke. *Stroke* **34**, 1790–1795 (2003).
95. Becker, K. J. Anti-leukocyte antibodies: LeukArrest (Hu23F2G) and Enlimomab (R6.5) in acute stroke. *Curr Med Res Opin* **18 Suppl 2**, s18–22 (2002).
96. Krams, M. *et al.* Acute Stroke Therapy by Inhibition of Neutrophils (ASTIN): an adaptive dose-response study of UK-279,276 in acute ischemic stroke. *Stroke* **34**, 2543–2548 (2003).
97. Mocco, J. *et al.* HuEP5C7 as a humanized monoclonal anti-E/P-selectin neurovascular protective strategy in a blinded placebo-controlled trial of nonhuman primate stroke.

Circ. Res. **91**, 907–914 (2002).

98. Huang, J. *et al.* Postischemic cerebrovascular E-selectin expression mediates tissue injury in murine stroke. *Stroke* **31**, 3047–3053 (2000).
99. Jin, A. Y. *et al.* Reduced blood brain barrier breakdown in P-selectin deficient mice following transient ischemic stroke: a future therapeutic target for treatment of stroke. *BMC Neurosci* **11**, 12 (2010).
100. Lam, F. W., Burns, A. R., Smith, C. W. & Rumbaut, R. E. Platelets enhance neutrophil transendothelial migration via P-selectin glycoprotein ligand-1. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* **300**, H468–475 (2011).
101. Sreeramkumar, V. *et al.* Neutrophils scan for activated platelets to initiate inflammation. *Science* **346**, 1234–1238 (2014).
102. Castellanos, M. *et al.* Serum cellular fibronectin and matrix metalloproteinase-9 as screening biomarkers for the prediction of parenchymal hematoma after thrombolytic therapy in acute ischemic stroke: a multicenter confirmatory study. *Stroke* **38**, 1855–1859 (2007).
103. Gidday, J. M. *et al.* Leukocyte-derived matrix metalloproteinase-9 mediates blood-brain barrier breakdown and is proinflammatory after transient focal cerebral ischemia. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* **289**, H558–568 (2005).
104. Shimakura, A. *et al.* Neutrophil elastase inhibition reduces cerebral ischemic damage in the middle cerebral artery occlusion. *Brain Res.* **858**, 55–60 (2000).

105. Stowe, A. M. *et al.* Neutrophil elastase and neurovascular injury following focal stroke and reperfusion. *Neurobiol. Dis.* **35**, 82–90 (2009).
106. Ikegame, Y. *et al.* Neutrophil elastase inhibitor prevents ischemic brain damage via reduction of vasogenic edema. *Hypertens. Res.* **33**, 703–707 (2010).
107. Tang, X. N., Zheng, Z., Giffard, R. G. & Yenari, M. A. Significance of marrow-derived nicotinamide adenine dinucleotide phosphate oxidase in experimental ischemic stroke. *Ann. Neurol.* **70**, 606–615 (2011).
108. Chen, H., Song, Y. S. & Chan, P. H. Inhibition of NADPH oxidase is neuroprotective after ischemia-reperfusion. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* **29**, 1262–1272 (2009).
109. Chiba, T. & Umegaki, K. Pivotal roles of monocytes/macrophages in stroke. *Mediators Inflamm.* **2013**, 759103 (2013).
110. Grau, A. J., Urbanek, C. & Palm, F. Common infections and the risk of stroke. *Nat Rev Neurol* **6**, 681–694 (2010).
111. Lindsberg, P. J. & Grau, A. J. Inflammation and infections as risk factors for ischemic stroke. *Stroke* **34**, 2518–2532 (2003).
112. Drake, C. *et al.* Brain inflammation is induced by co-morbidities and risk factors for stroke. *Brain Behav. Immun.* **25**, 1113–1122 (2011).
113. Palasik, W. *et al.* Assessment of relations between clinical outcome of ischemic stroke and activity of inflammatory processes in the acute phase based on examination of

- selected parameters. *Eur. Neurol.* **53**, 188–193 (2005).
114. Smith, C. J. *et al.* Variability of the systemic acute phase response after ischemic stroke. *J. Neurol. Sci.* **251**, 77–81 (2006).
115. Emsley, H. C. A. & Hopkins, S. J. Acute ischaemic stroke and infection: recent and emerging concepts. *Lancet Neurol* **7**, 341–353 (2008).
116. McColl, B. W., Rothwell, N. J. & Allan, S. M. Systemic inflammation alters the kinetics of cerebrovascular tight junction disruption after experimental stroke in mice. *J. Neurosci.* **28**, 9451–9462 (2008).
117. Bômout, L. & MacKenzie, E. T. Neuroprotection after focal cerebral ischaemia in hyperglycaemic and diabetic rats. *Neurosci. Lett.* **197**, 53–56 (1995).
118. Tureyen, K., Bowen, K., Liang, J., Dempsey, R. J. & Vemuganti, R. Exacerbated brain damage, edema and inflammation in type-2 diabetic mice subjected to focal ischemia. *J. Neurochem.* **116**, 499–507 (2011).
119. Kim, E., Tolhurst, A. T. & Cho, S. Deregulation of inflammatory response in the diabetic condition is associated with increased ischemic brain injury. *J Neuroinflammation* **11**, 83 (2014).
120. Garcia, J., Dang, J., Habib, P., Beyer, C. & Kipp, M. Comparison of infarct volume and behavioral deficit in Wistar Kyoto and spontaneously hypertensive rat after transient occlusion of the middle cerebral artery. *SpringerPlus* **2**, 414 (2013).

121. Spencer, S. J., Mouihate, A. & Pittman, Q. J. Peripheral inflammation exacerbates damage after global ischemia independently of temperature and acute brain inflammation. *Stroke* **38**, 1570–1577 (2007).
122. McColl, B. W., Rothwell, N. J. & Allan, S. M. Systemic inflammatory stimulus potentiates the acute phase and CXC chemokine responses to experimental stroke and exacerbates brain damage via interleukin-1- and neutrophil-dependent mechanisms. *J. Neurosci.* **27**, 4403–4412 (2007).
123. Macrez, R. *et al.* Stroke and the immune system: from pathophysiology to new therapeutic strategies. *Lancet Neurol* **10**, 471–480 (2011).
124. De Geyter, D. *et al.* Spontaneously hypertensive rats display reduced microglial activation in response to ischemic stroke and lipopolysaccharide. *J Neuroinflammation* **9**, 114 (2012).
125. Mishiro, K. *et al.* Diabetes mellitus aggravates hemorrhagic transformation after ischemic stroke via mitochondrial defects leading to endothelial apoptosis. *PLoS ONE* **9**, e103818 (2014).
126. WHO | Global status report on alcohol and health 2014. at
<http://www.who.int/substance_abuse/publications/global_alcohol_report/en/>
127. Rehm, J. *et al.* Global burden of disease and injury and economic cost attributable to alcohol use and alcohol-use disorders. *Lancet* **373**, 2223–2233 (2009).

128. Szabo, G. The 40th anniversary of the National Institute on Alcoholism and Alcohol Abuse: the impact on liver disease. *Hepatology* **52**, 10–12 (2010).
129. Hall, P. D. Pathological spectrum of alcoholic liver disease. *Alcohol Alcohol Suppl* **2**, 303–313 (1994).
130. Sidharthan, S. & Kottilil, S. Mechanisms of alcohol-induced hepatocellular carcinoma. *Hepatol Int* **8**, 452–457 (2014).
131. Gao, B. & Bataller, R. Alcoholic liver disease: pathogenesis and new therapeutic targets. *Gastroenterology* **141**, 1572–1585 (2011).
132. Ding, W.-X. *et al.* Autophagy reduces acute ethanol-induced hepatotoxicity and steatosis in mice. *Gastroenterology* **139**, 1740–1752 (2010).
133. Donohue, T. M. Autophagy and ethanol-induced liver injury. *World J. Gastroenterol.* **15**, 1178–1185 (2009).
134. Morimoto, M. *et al.* Modulation of experimental alcohol-induced liver disease by cytochrome P450 2E1 inhibitors. *Hepatology* **21**, 1610–1617 (1995).
135. Wu, D. & Cederbaum, A. I. Ethanol and arachidonic acid produce toxicity in hepatocytes from pyrazole-treated rats with high levels of CYP2E1. *Mol. Cell. Biochem.* **204**, 157–167 (2000).
136. Cederbaum, A. I. Cytochrome P450 2E1-dependent oxidant stress and upregulation of anti-oxidant defense in liver cells. *J. Gastroenterol. Hepatol.* **21 Suppl 3**, S22–25

(2006).

137. Moshage, H., Casini, A. & Lieber, C. S. Acetaldehyde selectively stimulates collagen production in cultured rat liver fat-storing cells but not in hepatocytes. *Hepatology* **12**, 511–518 (1990).
138. Nakano, M., Worner, T. M. & Lieber, C. S. Perivenular fibrosis in alcoholic liver injury: ultrastructure and histologic progression. *Gastroenterology* **83**, 777–785 (1982).
139. Nakano, M. & Lieber, C. S. Ultrastructure of initial stages of perivenular fibrosis in alcohol-fed baboons. *Am. J. Pathol.* **106**, 145–155 (1982).
140. Rintala, J. *et al.* Evidence of acetaldehyde-protein adduct formation in rat brain after lifelong consumption of ethanol. *Alcohol Alcohol.* **35**, 458–463 (2000).
141. Topic, A. & Djukic, M. Diagnostic characteristics and application of alcohol biomarkers. *Clin. Lab.* **59**, 233–245 (2013).
142. Delanghe, J. R. *et al.* Development and multicenter evaluation of the N latex CDT direct immunonephelometric assay for serum carbohydrate-deficient transferrin. *Clin. Chem.* **53**, 1115–1121 (2007).
143. Bortolotti, F., De Paoli, G. & Tagliaro, F. Carbohydrate-deficient transferrin (CDT) as a marker of alcohol abuse: a critical review of the literature 2001-2005. *J. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.* **841**, 96–109 (2006).

144. Allen, J. P. & Litten, R. Z. The role of laboratory tests in alcoholism treatment. *Journal of Substance Abuse Treatment* **20**, 81–85 (2001).
145. Nanau, R. M. & Neuman, M. G. Biomolecules and Biomarkers Used in Diagnosis of Alcohol Drinking and in Monitoring Therapeutic Interventions. *Biomolecules* **5**, 1339–1385 (2015).
146. Sato, N. *et al.* Sex difference in alcohol-related organ injury. *Alcohol. Clin. Exp. Res.* **25**, 40S–45S (2001).
147. Murphy, A., Roberts, B., Stickley, A. & McKee, M. Social factors associated with alcohol consumption in the former Soviet Union: a systematic review. *Alcohol Alcohol.* **47**, 711–718 (2012).
148. Chiva-Blanch, G., Arranz, S., Lamuela-Raventos, R. M. & Estruch, R. Effects of wine, alcohol and polyphenols on cardiovascular disease risk factors: evidences from human studies. *Alcohol Alcohol.* **48**, 270–277 (2013).
149. Sayon-Orea, C., Martinez-Gonzalez, M. A. & Bes-Rastrollo, M. Alcohol consumption and body weight: a systematic review. *Nutr. Rev.* **69**, 419–431 (2011).
150. Schneider, M., Chersich, M., Neuman, M. & Parry, C. Alcohol consumption and HIV/AIDS: the neglected interface. *Addiction* **107**, 1369–1371 (2012).
151. Fletcher, L. M. Alcohol and iron: one glass of red or more? *J. Gastroenterol. Hepatol.* **11**, 1039–1041 (1996).

152. Lieb, M. *et al.* Effects of alcohol consumption on iron metabolism. *Am J Drug Alcohol Abuse* **37**, 68–73 (2011).
153. Weathermon, R. & Crabb, D. W. Alcohol and medication interactions. *Alcohol Res Health* **23**, 40–54 (1999).
154. Bataller, R., North, K. E. & Brenner, D. A. Genetic polymorphisms and the progression of liver fibrosis: a critical appraisal. *Hepatology* **37**, 493–503 (2003).
155. Sun, F., Tsuritani, I. & Yamada, Y. Contribution of genetic polymorphisms in ethanol-metabolizing enzymes to problem drinking behavior in middle-aged Japanese men. *Behav. Genet.* **32**, 229–236 (2002).
156. Duddempudi, A. T. Immunology in alcoholic liver disease. *Clin Liver Dis* **16**, 687–698 (2012).
157. Thurman, R. G. *et al.* The role of gut-derived bacterial toxins and free radicals in alcohol-induced liver injury. *J. Gastroenterol. Hepatol.* **13 Suppl**, S39–50 (1998).
158. Siegmund, S., Spanagel, R. & Singer, M. V. Role of the brain-gut axis in alcohol-related gastrointestinal diseases--what can we learn from new animal models? *J. Physiol. Pharmacol.* **54 Suppl 4**, 191–207 (2003).
159. Szabo, G. & Bala, S. Alcoholic liver disease and the gut-liver axis. *World J. Gastroenterol.* **16**, 1321–1329 (2010).

160. Enomoto, N. *et al.* Development of a new, simple rat model of early alcohol-induced liver injury based on sensitization of Kupffer cells. *Hepatology* **29**, 1680–1689 (1999).
161. Fukui, H., Brauner, B., Bode, J. C. & Bode, C. Plasma endotoxin concentrations in patients with alcoholic and non-alcoholic liver disease: reevaluation with an improved chromogenic assay. *J. Hepatol.* **12**, 162–169 (1991).
162. Kishore, R., McMullen, M. R., Cocuzzi, E. & Nagy, L. E. Lipopolysaccharide-mediated signal transduction: Stabilization of TNF- α mRNA contributes to increased lipopolysaccharide-stimulated TNF- α production by Kupffer cells after chronic ethanol feeding. *Comp Hepatol* **3 Suppl 1**, S31 (2004).
163. Szabo, G. & Mandrekar, P. A Recent Perspective on Alcohol, Immunity, and Host Defense. *Alcoholism: Clinical and Experimental Research* **33**, 220–232 (2009).
164. Cook, R. T. Alcohol abuse, alcoholism, and damage to the immune system--a review. *Alcohol. Clin. Exp. Res.* **22**, 1927–1942 (1998).
165. Szabo, G. Consequences of alcohol consumption on host defence. *Alcohol Alcohol.* **34**, 830–841 (1999).
166. Jerrells, T. R. & Weinberg, J. Influence of ethanol consumption on immune competence of adult animals exposed to ethanol in utero. *Alcohol. Clin. Exp. Res.* **22**, 391–400 (1998).
167. Chiappelli, F. *et al.* Fetal alcohol exposure augments the blunting of tumor necrosis factor production in vitro resulting from in vivo priming with lipopolysaccharide in young

- adult male but not female rats. *Alcohol. Clin. Exp. Res.* **21**, 1542–1546 (1997).
168. Goral, J., Karavitis, J. & Kovacs, E. J. Exposure-dependent effects of ethanol on the innate immune system. *Alcohol* **42**, 237–247 (2008).
169. Nagy, L. E. Recent insights into the role of the innate immune system in the development of alcoholic liver disease. *Exp. Biol. Med. (Maywood)* **228**, 882–890 (2003).
170. Bautista, A. P. Chronic alcohol intoxication primes Kupffer cells and endothelial cells for enhanced CC-chemokine production and concomitantly suppresses phagocytosis and chemotaxis. *Front. Biosci.* **7**, a117–125 (2002).
171. Adachi, Y., Bradford, B. U., Gao, W., Bojes, H. K. & Thurman, R. G. Inactivation of Kupffer cells prevents early alcohol-induced liver injury. *Hepatology* **20**, 453–460 (1994).
172. Hines, I. N. & Wheeler, M. D. Recent advances in alcoholic liver disease III. Role of the innate immune response in alcoholic hepatitis. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* **287**, G310–314 (2004).
173. Wang, H. J., Zakhari, S. & Jung, M. K. Alcohol, inflammation, and gut-liver-brain interactions in tissue damage and disease development. *World J. Gastroenterol.* **16**, 1304–1313 (2010).
174. Lemmers, A. *et al.* The interleukin-17 pathway is involved in human alcoholic liver disease. *Hepatology* **49**, 646–657 (2009).

175. Bautista, A. P. Chronic alcohol intoxication induces hepatic injury through enhanced macrophage inflammatory protein-2 production and intercellular adhesion molecule-1 expression in the liver. *Hepatology* **25**, 335–342 (1997).
176. Ramaiah, S. K. & Jaeschke, H. Hepatic neutrophil infiltration in the pathogenesis of alcohol-induced liver injury. *Toxicol. Mech. Methods* **17**, 431–440 (2007).
177. Bertola, A., Park, O. & Gao, B. Chronic plus binge ethanol feeding synergistically induces neutrophil infiltration and liver injury in mice: a critical role for E-selectin. *Hepatology* **58**, 1814–1823 (2013).
178. Bautista, A. P. Neutrophilic infiltration in alcoholic hepatitis. *Alcohol* **27**, 17–21 (2002).
179. Jaeschke, H. Neutrophil-mediated tissue injury in alcoholic hepatitis. *Alcohol* **27**, 23–27 (2002).
180. Dominguez, M. *et al.* Hepatic expression of CXC chemokines predicts portal hypertension and survival in patients with alcoholic hepatitis. *Gastroenterology* **136**, 1639–1650 (2009).
181. Taïeb, J. *et al.* Polymorphonuclear neutrophils are a source of hepatocyte growth factor in patients with severe alcoholic hepatitis. *J. Hepatol.* **36**, 342–348 (2002).
182. Reilly, M. T., Noronha, A. & Warren, K. Perspectives on the neuroscience of alcohol from the National Institute on Alcohol Abuse and Alcoholism. *Handb Clin Neurol* **125**, 15–29 (2014).

183. Charness, M. E. Brain lesions in alcoholics. *Alcohol. Clin. Exp. Res.* **17**, 2–11 (1993).
184. Zahr, N. M., Kaufman, K. L. & Harper, C. G. Clinical and pathological features of alcohol-related brain damage. *Nat Rev Neurol* **7**, 284–294 (2011).
185. Kril, J. J., Halliday, G. M., Svoboda, M. D. & Cartwright, H. The cerebral cortex is damaged in chronic alcoholics. *Neuroscience* **79**, 983–998 (1997).
186. Kril, J. J. & Halliday, G. M. Brain shrinkage in alcoholics: a decade on and what have we learned? *Prog. Neurobiol.* **58**, 381–387 (1999).
187. Alfonso-Loeches, S. & Guerri, C. Molecular and behavioral aspects of the actions of alcohol on the adult and developing brain. *Crit Rev Clin Lab Sci* **48**, 19–47 (2011).
188. Liu, J. *et al.* Patterns of gene expression in the frontal cortex discriminate alcoholic from nonalcoholic individuals. *Neuropsychopharmacology* **31**, 1574–1582 (2006).
189. Lewohl, J. M., Wixey, J., Harper, C. G. & Dodd, P. R. Expression of MBP, PLP, MAG, CNP, and GFAP in the Human Alcoholic Brain. *Alcohol. Clin. Exp. Res.* **29**, 1698–1705 (2005).
190. Matute, C. *et al.* Excitotoxic damage to white matter. *J. Anat.* **210**, 693–702 (2007).
191. Qin, L. *et al.* Increased systemic and brain cytokine production and neuroinflammation by endotoxin following ethanol treatment. *J Neuroinflammation* **5**, 10 (2008).

192. Crews, F. T. & Vetreno, R. P. Neuroimmune basis of alcoholic brain damage. *Int. Rev. Neurobiol.* **118**, 315–357 (2014).
193. Qin, L. & Crews, F. T. NADPH oxidase and reactive oxygen species contribute to alcohol-induced microglial activation and neurodegeneration. *J Neuroinflammation* **9**, 5 (2012).
194. Abdul Muneer, P. M., Alikunju, S., Szlachetka, A. M., Mercer, A. J. & Haorah, J. Ethanol impairs glucose uptake by human astrocytes and neurons: protective effects of acetyl-L-carnitine. *Int J Physiol Pathophysiol Pharmacol* **3**, 48–56 (2011).
195. Zhao, Y.-N. *et al.* Activated microglia are implicated in cognitive deficits, neuronal death, and successful recovery following intermittent ethanol exposure. *Behav. Brain Res.* **236**, 270–282 (2013).
196. Crews, F. T., Qin, L., Sheedy, D., Vetreno, R. P. & Zou, J. High mobility group box 1/Toll-like receptor danger signaling increases brain neuroimmune activation in alcohol dependence. *Biol. Psychiatry* **73**, 602–612 (2013).
197. Fernandez-Lizarbe, S., Montesinos, J. & Guerri, C. Ethanol induces TLR4/TLR2 association, triggering an inflammatory response in microglial cells. *J. Neurochem.* **126**, 261–273 (2013).
198. He, J. & Crews, F. T. Increased MCP-1 and microglia in various regions of the human alcoholic brain. *Exp. Neurol.* **210**, 349–358 (2008).

199. Zou, J. & Crews, F. T. Inflammasome-IL-1 β Signaling Mediates Ethanol Inhibition of Hippocampal Neurogenesis. *Front Neurosci* **6**, 77 (2012).
200. Agrawal, R. G., Hewetson, A., George, C. M., Syapin, P. J. & Bergeson, S. E. Minocycline reduces ethanol drinking. *Brain, Behavior, and Immunity* **25**, Supplement 1, S165–S169 (2011).
201. Qin, L. & Crews, F. T. Chronic ethanol increases systemic TLR3 agonist-induced neuroinflammation and neurodegeneration. *J Neuroinflammation* **9**, 130 (2012).
202. Mayfield, J., Ferguson, L. & Harris, R. A. Neuroimmune signaling: a key component of alcohol abuse. *Curr. Opin. Neurobiol.* **23**, 513–520 (2013).
203. Cui, C., Shurtleff, D. & Harris, R. A. Neuroimmune mechanisms of alcohol and drug addiction. *Int. Rev. Neurobiol.* **118**, 1–12 (2014).
204. Bajo, M. *et al.* Innate immune factors modulate ethanol interaction with GABAergic transmission in mouse central amygdala. *Brain Behav. Immun.* **40**, 191–202 (2014).
205. Suvarna, N. *et al.* Ethanol alters trafficking and functional N-methyl-D-aspartate receptor NR2 subunit ratio via H-Ras. *J. Biol. Chem.* **280**, 31450–31459 (2005).
206. Alho, H. *et al.* Alcohol misuse increases serum antibodies to oxidized LDL and C-reactive protein. *Alcohol Alcohol.* **39**, 312–315 (2004).
207. Liukkonen, T. *et al.* The association between anxiety and C-reactive protein (CRP) levels: results from the Northern Finland 1966 birth cohort study. *Eur. Psychiatry* **26**,

363–369 (2011).

208. Achur, R. N., Freeman, W. M. & Vrana, K. E. Circulating cytokines as biomarkers of alcohol abuse and alcoholism. *J Neuroimmune Pharmacol* **5**, 83–91 (2010).
209. Khoruts, A., Stahnke, L., McClain, C. J., Logan, G. & Allen, J. I. Circulating tumor necrosis factor, interleukin-1 and interleukin-6 concentrations in chronic alcoholic patients. *Hepatology* **13**, 267–276 (1991).
210. McClain, C., Hill, D., Schmidt, J. & Diehl, A. M. Cytokines and alcoholic liver disease. *Semin. Liver Dis.* **13**, 170–182 (1993).
211. Pan, W. & Kastin, A. J. TNFalpha transport across the blood-brain barrier is abolished in receptor knockout mice. *Exp. Neurol.* **174**, 193–200 (2002).
212. Szabo, G. & Lippai, D. Converging actions of alcohol on liver and brain immune signaling. *Int. Rev. Neurobiol.* **118**, 359–380 (2014).
213. la Monte, S. M. de, Longato, L., Tong, M., DeNucci, S. & Wands, J. R. The liver-brain axis of alcohol-mediated neurodegeneration: role of toxic lipids. *Int J Environ Res Public Health* **6**, 2055–2075 (2009).
214. Campbell, S. J. *et al.* Sickness behaviour is induced by a peripheral CXC-chemokine also expressed in multiple sclerosis and EAE. *Brain Behav. Immun.* **24**, 738–746 (2010).
215. Caicoya, M., Rodriguez, T., Corrales, C., Cuello, R. & Lasheras, C. Alcohol and stroke: a community case-control study in Asturias, Spain. *J Clin Epidemiol* **52**, 677–684

(1999).

216. Gill, J. S., Zezulka, A. V., Shipley, M. J., Gill, S. K. & Beevers, D. G. Stroke and alcohol consumption. *N. Engl. J. Med.* **315**, 1041–1046 (1986).
217. Hillbom, M., Juvela, S. & Numminen, H. Alcohol intake and the risk of stroke. *J Cardiovasc Risk* **6**, 223–228 (1999).
218. Hart, C. L., Smith, G. D., Hole, D. J. & Hawthorne, V. M. Alcohol consumption and mortality from all causes, coronary heart disease, and stroke: results from a prospective cohort study of scottish men with 21 years of follow up. *BMJ* **318**, 1725–1729 (1999).
219. Reynolds, K. *et al.* Alcohol consumption and risk of stroke: a meta-analysis. *JAMA* **289**, 579–588 (2003).
220. Zhang, C. *et al.* Alcohol intake and risk of stroke: A dose–response meta-analysis of prospective studies. *International Journal of Cardiology* **174**, 669–677 (2014).
221. Hansagi, H., Romelsjö, A., Gerhardsson de Verdier, M., Andréasson, S. & Leifman, A. Alcohol consumption and stroke mortality. 20-year follow-up of 15,077 men and women. *Stroke* **26**, 1768–1773 (1995).
222. Patra, J. *et al.* Alcohol consumption and the risk of morbidity and mortality for different stroke types--a systematic review and meta-analysis. *BMC Public Health* **10**, 258 (2010).
223. Patra, J. *et al.* Alcohol consumption and the risk of morbidity and mortality for different stroke types--a systematic review and meta-analysis. *BMC Public Health* **10**, 258

(2010).

224. Mandybur, T. I. & Mendenhall, C. L. The effects of chronic alcoholism on development of ischemic cerebral infarcts following unilateral carotid artery ligation in gerbils. *Alcohol. Clin. Exp. Res.* **7**, 357–361 (1983).
225. Mahoney, F. I. & Barthel, D. W. FUNCTIONAL EVALUATION: THE BARTHEL INDEX. *Md State Med J* **14**, 61–65 (1965).
226. Rist, P. M. *et al.* Alcohol consumption and functional outcome after stroke in men. *Stroke* **41**, 141–146 (2010).
227. Zhao, H., Mayhan, W. G., Arrick, D. M., Xiong, W. & Sun, H. Alcohol-induced exacerbation of ischemic brain injury: role of NAD(P)H oxidase. *Alcohol. Clin. Exp. Res.* **34**, 1948–1955 (2010).
228. Sun, H., Zhao, H., Sharpe, G. M., Arrick, D. M. & Mayhan, W. G. Effect of chronic alcohol consumption on brain damage following transient focal ischemia. *Brain Res.* **1194**, 73–80 (2008).
229. Schaar, K. L., Brenneman, M. M. & Savitz, S. I. Functional assessments in the rodent stroke model. *Exp Transl Stroke Med* **2**, 13 (2010).
230. Zhao, H., Mayhan, W. G., Arrick, D. M., Xiong, W. & Sun, H. Dose-related influence of chronic alcohol consumption on cerebral ischemia/reperfusion injury. *Alcohol. Clin. Exp. Res.* **35**, 1265–1269 (2011).

231. Lemarchand, E. *et al.* Impact of alcohol consumption on the outcome of ischemic stroke and thrombolysis: role of the hepatic clearance of tissue-type plasminogen activator. *Stroke* **46**, 1641–1650 (2015).
232. Sun, H., Xiong, W., Arrick, D. M. & Mayhan, W. G. Low-dose alcohol consumption protects against transient focal cerebral ischemia in mice: possible role of PPAR γ . *PLoS ONE* **7**, e41716 (2012).
233. Simon, R. P., Swan, J. H., Griffiths, T. & Meldrum, B. S. Blockade of N-methyl-D-aspartate receptors may protect against ischemic damage in the brain. *Science* **226**, 850–852 (1984).
234. Görgülü, A. *et al.* Reduction of edema and infarction by Memantine and MK-801 after focal cerebral ischaemia and reperfusion in rat. *Acta Neurochir (Wien)* **142**, 1287–1292 (2000).
235. Yang, G. *et al.* Reduction of vasogenic edema and infarction by MK-801 in rats after temporary focal cerebral ischemia. *Neurosurgery* **34**, 339–345; discussion 345 (1994).
236. Longa, E. Z., Weinstein, P. R., Carlson, S. & Cummins, R. Reversible middle cerebral artery occlusion without craniectomy in rats. *Stroke* **20**, 84–91 (1989).
237. Bederson, J. B. *et al.* Rat middle cerebral artery occlusion: evaluation of the model and development of a neurologic examination. *Stroke* **17**, 472–476 (1986).
238. Marche, K., Danel, T. & Bordet, R. Fetal alcohol-induced hyperactivity is reversed by treatment with the PPAR α agonist fenofibrate in a rat model. *Psychopharmacology*

(Berl.) **214**, 285–296 (2011).

239. Plaisier, F. *et al.* Stobadine-induced hastening of sensorimotor recovery after focal ischemia/reperfusion is associated with cerebrovascular protection. *Brain Res.* **1208**, 240–249 (2008).
240. Zausinger, S., Hungerhuber, E., Baethmann, A., Reulen, H. & Schmid-Elsaesser, R. Neurological impairment in rats after transient middle cerebral artery occlusion: a comparative study under various treatment paradigms. *Brain Res.* **863**, 94–105 (2000).
241. Paxinos, G. & Watson, C. *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates*. (1986).
242. Lin, T. N., He, Y. Y., Wu, G., Khan, M. & Hsu, C. Y. Effect of brain edema on infarct volume in a focal cerebral ischemia model in rats. *Stroke* **24**, 117–121 (1993).
243. Auger, F. *et al.* Long-Term Risperidone Treatment Induces Visceral Adiposity Associated with Hepatic Steatosis in Mice: A Magnetic Resonance Approach. *Schizophrenia Research and Treatment* **2014**, e429291 (2014).
244. Lyden, P. *et al.* Improved reliability of the NIH Stroke Scale using video training. NINDS TPA Stroke Study Group. *Stroke* **25**, 2220–2226 (1994).
245. Adams, H. P., Jr *et al.* Classification of subtype of acute ischemic stroke. Definitions for use in a multicenter clinical trial. TOAST. Trial of Org 10172 in Acute Stroke Treatment. *Stroke* **24**, 35–41 (1993).

246. Deplanque, D. *et al.* Prior TIA, lipid-lowering drug use, and physical activity decrease ischemic stroke severity. *Neurology* **67**, 1403–1410 (2006).
247. Reynaud, M. *et al.* Objective diagnosis of alcohol abuse: compared values of carbohydrate-deficient transferrin (CDT), gamma-glutamyl transferase (GGT), and mean corpuscular volume (MCV). *Alcohol. Clin. Exp. Res.* **24**, 1414–1419 (2000).
248. Bendel, R. & Afifi, A. Comparison of stopping rules in forward regression. 46–53 (1977).
249. Glantz, S. & Slinker, B. *Primer of applied regression and analysis of variance*. (Mcgraw-Hill, 1990).
250. Arvidsson, A., Collin, T., Kirik, D., Kokaia, Z. & Lindvall, O. Neuronal replacement from endogenous precursors in the adult brain after stroke. *Nat. Med.* **8**, 963–970 (2002).
251. Virley, D. *et al.* A temporal MRI assessment of neuropathology after transient middle cerebral artery occlusion in the rat: correlations with behavior. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* **20**, 563–582 (2000).
252. Sotgiu, S. *et al.* Inflammatory biomarkers in blood of patients with acute brain ischemia. *Eur. J. Neurol.* **13**, 505–513 (2006).
253. Whiteley, W., Tian, Y. & Jickling, G. C. Blood biomarkers in stroke: research and clinical practice. *Int J Stroke* **7**, 435–439 (2012).
254. Daniel, F. B., Robinson, M., Stober, J. A., Page, N. P. & Olson, G. R. Ninety-day toxicity study of chloral hydrate in the Sprague-Dawley rat. *Drug Chem Toxicol* **15**, 217–232

(1992).

255. Campos, F. *et al.* Neuroprotection by glutamate oxaloacetate transaminase in ischemic stroke: an experimental study. *J Cereb Blood Flow Metab* **31**, 1378–1386 (2011).
256. Campos, F. *et al.* High blood glutamate oxaloacetate transaminase levels are associated with good functional outcome in acute ischemic stroke. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* **31**, 1387–1393 (2011).
257. Heuschmann, P. U. *et al.* Three-month stroke outcome: the European Registers of Stroke (EROS) investigators. *Neurology* **76**, 159–165 (2011).
258. Dirks, M. *et al.* The effectiveness of thrombolysis with intravenous alteplase for acute ischemic stroke in daily practice. *Int J Stroke* **7**, 289–292 (2012).
259. Reynaud, M. *et al.* Objective Diagnosis of Alcohol Abuse: Compared Values of Carbohydrate-Deficient Transferrin (CDT), γ -Glutamyl Transferase (GGT), and Mean Corpuscular Volume (MCV). *Alcoholism: Clinical and Experimental Research* **24**, 1414–1419 (2000).
260. Chin, V. S., Van Skike, C. E. & Matthews, D. B. Effects of ethanol on hippocampal function during adolescence: a look at the past and thoughts on the future. *Alcohol* **44**, 3–14 (2010).
261. Ehlers, C. L., Liu, W., Wills, D. N. & Crews, F. T. Periadolescent ethanol vapor exposure persistently reduces measures of hippocampal neurogenesis that are associated with behavioral outcomes in adulthood. *Neuroscience* **244**, 1–15 (2013).

262. Conigrave, K. M., Davies, P., Haber, P. & Whitfield, J. B. Traditional markers of excessive alcohol use. *Addiction* **98 Suppl 2**, 31–43 (2003).
263. Tirapelli, L. F. *et al.* Chronic ethanol consumption induces histopathological changes and increases nitric oxide generation in the rat liver. *Tissue Cell* **43**, 384–391 (2011).
264. Bertola, A., Mathews, S., Ki, S. H., Wang, H. & Gao, B. Mouse model of chronic and binge ethanol feeding (the NIAAA model). *Nat. Protocols* **8**, 627–637 (2013).
265. La résurrection de Georges-Frédéric Haendel. at
<<http://www.biblisem.net/narratio/zweihaen.htm>>

Abstract

Ischaemic stroke is a major cause of disability and death in Europe. Ethanol is a widely consumed drug and chronic ethanol consumption is a participating factor in ischaemic stroke (Reynolds et al., 2003). Chronic and excessive ethanol consumption is associated with an increased risk of mortality and morbidity from ischaemic stroke (Zhang et al., 2014). It may increase consequences of ischaemic brain injury in animals (Zhao et al., 2010, Lemarchand et al., 2015). Oxidative stress and glutamatergic excitotoxicity may play an important role in exacerbating ischaemic damage following chronic consumption of ethanol (Zhao et al., 2010; Zhao et al., 2011). The primary aim of my thesis was to assess whether chronic excessive ethanol consumption has a deleterious effect on ischaemic brain damage both in human and in a rat model. The secondary aim was to study the post-ischaemic inflammation in the brain and in the liver at short and intermediate terms. Wistar male rats were subjected to chronic administration of ethanol (10% or 35% v/v, 5ml/kg, twice per day, 4 weeks prior operation) or water (vehicle), followed by middle cerebral artery occlusion (OACM). The effects of ethanol ingestion on infarct volume, neurologic and motor deficits were determined at 24 hours (J1) and at 7 days (J7) of reperfusion. We quantified the number of activated microglia in the ipsilateral hemisphere and additionally measured the number of neutrophils and levels of ICAM-1 and VCAM-1 mRNA in the ipsilateral hemisphere and liver. Further, we examined the steatosis by comparing oil-red coloration of J1, J7 and non-ischemic rats to assess the physiologic liver status in the 3 groups. Patients with supratentorial cerebral ischaemia were recruited within 48 hours of symptom onset. Heavy drinkers were defined by a weekly consumption of ≥ 300 g ethanol and severe ischaemic strokes (score ≥ 6 according to the National Institutes of Health Stroke Scale, NIHSS). The NIHSS score was evaluated within 48 hours. We performed measurements of carbohydrate-deficient transferrin (CDT, biomarker of chronic excessive ethanol consumption) and inflammatory markers plasmatic levels. Being a heavy drinker and having a higher plasma level of neutrophils were independently associated with a higher baseline severity of the neurological deficit in patients with supratentorial ischemic stroke or transient ischemic attack within 48 hours. Excessive and chronic ethanol consumption in non-ischaemic rats conferred an increased hepatic steatosis and an inflammatory condition in the cortex, the striatum and the liver, observed as increased expression of adhesion proteins. However, neutrophil infiltration was not observed in the liver or in the brain. In the OACM model, chronic consumption of 35% ethanol worsened ischemic stroke lesions and motor deficits, compared to non-ethanol-exposed rats. Neutrophil infiltration and the mRNA levels of VCAM-1 and ICAM-1 are increased in the brain and in the liver of ischaemic rats exposed to 35% ethanol, compared to control ischaemic rats, at J1 and J7. The aggravation of neurologic and functional deficits was associated with increased post-ischaemic inflammation in both the liver and brain, as observed by microglial activation, neutrophil infiltration and leukocyte adhesion at short and intermediate terms.

Résumé

L'accident vasculaire cérébral (AVC) ischémique est une principale cause de décès et d'handicap en Europe. L'éthanol est une drogue largement consommée et la consommation chronique d'éthanol est un facteur participant à la survenue d'AVC ischémique (Reynolds et al., 2003). La consommation chronique et excessive d'éthanol est associée à un risque accru de mortalité et de morbidité suite à un AVC ischémique (Zhang et al., 2014). Ce facteur aggraverait les lésions ischémiques cérébrales dans les modèles animaux (Zhao et al. 2010 ; Lemarchand et al., 2015). Le stress oxydatif et l'excitotoxicité glutamatergique peuvent jouer un rôle important dans l'exacerbation de l'infarctus cérébral après une consommation chronique et excessive d'éthanol (Zhao et al. 2010 ; Zhao et al. 2011). Le premier objectif de la thèse est de vérifier que la consommation chronique et excessive d'éthanol aggrave les dommages cérébraux ischémiques chez les patients et dans un modèle animal d'ischémie cérébrale. Le deuxième objectif est d'étudier l'inflammation post-ischémique dans le cerveau et dans le foie à court et moyen termes. Des rats mâles Wistar ont été soumis à l'administration chronique d'éthanol (10% ou 35% v/v, 5 ml / kg, deux fois par jour, quatre semaines avant l'opération) ou d'eau (vehicule), suivie d'une occlusion de l'artère cérébrale moyenne (OACM). Nous avons déterminé les effets de l'ingestion d'éthanol sur le volume de l'infarctus, des déficits neurologiques et moteurs, à 24 heures (J1) et à 7 jours (J7) de reperfusion sanguine. Nous avons quantifié le nombre de microglies activées dans l'hémisphère ipsilatéral. Nous avons mesuré le nombre de neutrophiles et les taux d'ARNm d'ICAM-1 et de VCAM-1 dans l'hémisphère ipsilatéral et dans le foie. Nous avons examiné la stéatose et l'état inflammatoire dans le foie des rats non ischémiés, pour évaluer l'état physiologique hépatique dans les 3 groupes à J1 et J7. Nous avons recruté 435 patients ayant eu une ischémie cérébrale supratentorielle dans les 48 heures après l'apparition des symptômes. La consommation excessive et chronique d'éthanol est définie par une prise hebdomadaire ≥ 300 g d'éthanol et les AVC ischémiques sévères par un score National Institutes of Health Stroke Scale (NIHSS) ≥ 6 . Le score NIHSS a été évalué dans les 48 heures. Nous avons effectué des mesures des taux de transferrine déficiente en carbohydrates (CDT, biomarqueur de la consommation chronique excessive d'éthanol) et de marqueurs inflammatoires. Être un consommateur excessif et avoir un taux plasmatique élevé de neutrophiles étaient indépendamment associés à des déficits neurologiques plus sévères chez les patients ayant subi un AVC ischémique ou accident ischémique transitoire, dans les 48 heures. La consommation excessive et chronique d'éthanol chez le rat non ischémié a induit une stéatose hépatique et une augmentation d'un état inflammatoire dans le cortex, le striatum et le foie par l'intermédiaire d'augmentation de l'expression de protéines d'adhésion. Toutefois, aucune infiltration des neutrophiles n'a été notée dans le foie ou dans le cerveau. Dans le modèle OACM, la consommation chronique d'éthanol 35 % aggravait le volume des lésions de l'AVC ischémique et les déficits moteurs, comparativement aux rats non exposés à l'éthanol. L'aggravation des déficits neurologiques et fonctionnels a été expliquée par une augmentation de l'inflammation post-ischémique dans le foie et le cerveau, via l'activation de la microglie, l'infiltration des neutrophiles, et l'expression des protéines d'adhésion leucocytaire à court et moyen termes.